Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr.Dr. W. N e u m a n n)

Über Veränderungen von Zellstruktur und Zellstoffwechsel durch tierische Gifte

Habilitationsschrift

verfasst und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach der Pharmakologie und Toxikologie
vorgelegt von

Dr. med. Ernst Habermann
aus Gössenheim (Unterfr.)

Würzburg 1955

Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin, Bd. 129, S. 436—464 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. W. NEUMANN)

Über die Wirkung tierischer Gifte auf Erythrocyten

Von

ERNST HABERMANN

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. August 1957)

4. 4. 56

Während man sich mit der Wirkungsweise anderer Hämolytica, wie der Saponine und der Schwermetallsalze, experimentell und theoretisch eingehend beschäftigt hat, ist dies bei der Hämolyse durch tierische Gifte nur beschränkt der Fall. Zwar haben sich speziell beim Bienengift seit den grundlegenden Untersuchungen von Langer u. a. noch Lacaillade, Nagamitu, Reinert, Derevici und Mitarbeiter, Lauter u. Griggs, Grosse u. Tauböck, Wilbrandt, Levi; Schwenkert, Gastpar u. Seitz mit diesem Problem befaßt. Die Schwierigkeit, weitgehend gereinigte oder wenigstens unzersetzte Präparate in die Hand zu bekommen und die damit zu erklärende unvollkommene Kenntnis von Zusammensetzung und Wirkungsweise tierischer Gifte im allgemeinen ließen dieses Gebiet bis vor kurzem als wenig dankbar erscheinen. Neuere Arbeiten (Neumann, Habermann u. Amend; Neumann, Habermann u. Hansen; Neumann u. Habermann (1), F. G. Fischer u. W. P. Neumann) haben jedoch Zusammensetzung und Wirkungsweise des Bienengiftes prinzipiell geklärt, einzelne Wirkqualitäten wurden in weitergespannten Untersuchungen eingehend studiert (Neumann u. Habermann (2), Habermann u. Neumann (1), Habermann (1, 2, 3)).

Für die Kenntnis der Hämolyse war die Unterscheidung und Darstellung eines direkt hämolysierenden, d. h. gewaschene Erythrocyten angreifenden Prinzips (Bienengiftfraktion I (F I)) und eines indirekt, d. h. nur in Gegenwart bestimmter Phospholipoide wirkenden Prinzips, einer Phospholipase A (Neumann, Habermann u. Hansen), entscheidend. Bald zeigte sich, daß gereinigtes Bienengift und dessen direkt hämolysierendes Prinzip äußerst aktive, eigenartige Hämolytica darstellen, welche sich z. B. bezüglich ihrer Dosis-Wirkungskurve (Neumann u. Habermann (1)) und der durch sie hervorgerufenen Veränderungen der Erythrocytenschatten (Habermann u. Mölbert) wesentlich von anderen Lysinen unterscheiden. Da bei gewissen Schlangengiften ganz ähnliche

Verhältnisse vorliegen, ergibt sich hier eine neue Klasse von Lysinen, deren Mitglieder durch Basicität, hohes Molekulargewicht und Erzeugung netzartiger Veränderungen am Erythrocyten charakterisiert sind. Im folgenden wird am Modell des Bienengiftes eingehend über Kinetik und Wirkungsweise dieser Stoffgruppe berichtet, nachdem ein kurzer Überblick bereits früher gegeben wurde (HABERMANN (4)).

1. Allgemeines zur Methodik

Menschenblut wurde 4:1 mit 3,8%igem Natriumcitrat versetzt. Nach Zentrifugieren und 3maliger Waschung des Bodensatzes mit physiologischer Kochsalzlösung wurde das Gesamtvolumen der Erythrocyten bestimmt und — in der Regel mit Phosphatpuffer p_H 7,0 nach SÖRENSEN, der mit Kochsalzlösung (0,85%) 1:4 verdünnt war — eine 2,4-, 1,2- oder 0,6%ige Erythrocytensuspension hergestellt, die 3—6 Std nach der Venenpunktion zur Verwendung kam.

Meist wurden 5 cm^3 Giftlösung in Puffer mit 5 cm^3 einer 1,2%igen Erythrocytensuspension im Wasserbad 40 min bei 37° gehalten. Anschließend wurde 3 min bei 3200 U/min zentrifugiert und im Überstehenden das freigesetzte Hämoglobin bestimmt, z. T. im Pulfrich-Photometer nach Zusatz von Ferricyanidkalium als Methämoglobin mit dem Filter S 50 oder — bei Gegenwart von Zinksalzen oder Cyanid — ohne Zusatz mit dem Filter S 55. Die Giftkonzentration, welche gerade 50% Hämolyse hervorrief, wurde graphisch ermittelt (D_{50}). In einem Teil der Versuche wurde die Oxyhämoglobinbande bei 577 $m\mu$ mit einem Unicam- oder Beckman-DU-Spektrophotometer ausgemessen. Unter den gewählten Bedingungen änderte sich das Hämoglobinspektrum nicht, die Eichkurven waren linear. Variation der Dauer des Zentrifugierens (2—4 min) beeinflußte den Grad der Fraktion I-Hämolyse nicht; Herabsetzung der Tourenzahl von 3200 auf 2500 U/min dagegen minderte die Hämoglobinfreisetzung deutlich. Bei 3 Versuchen, die am gleichen Tage nebeneinander ausgeführt wurden, differierten die 50%-Werte nur um $\pm 5\%$. Bei Versuchen an verschiedenen Tagen war die Streuung dagegen erheblich größer, zumal verschiedene Blutspender herangezogen werden mußten. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde der 50%-Wert des „Versuchsansatzes" in Beziehung gesetzt zu der Giftmenge, welche 50%ige Hämolyse unter „Standardbedingungen" hervorrief.

Die Substanzen, deren Einfluß auf die Hämolyse untersucht werden sollte, blieben vor Versuchsbeginn 30 min bei Zimmertemperatur mit der bereits verdünnten Giftlösung stehen, ehe die Erythrocyten zugesetzt wurden. Sämtliche Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser bereitet. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endverdünnungen.

Verwendete Gifte. 1. Getrocknetes, natives Bienengift, von uns im Herbst 1952 mit Unterstützung der Firma H. Mack Nachf., Illertissen, gewonnen. Bienen stachen durch eine dünne Gummimembran, die auf der Gegenseite austretenden Gifttröpfchen wurden sofort im Luftstrom getrocknet.

2. Gereinigtes Bienengift, von der Firma H. Mack Nachf., über das Pikrat gereinigt (Charge 1952).

3. Fraktion I von Bienengift (F I): a) papierelektrophoretisch nach NEUMANN u. HABERMANN (1), b) chromatographisch von W. P. NEUMANN nach F. G. FISCHER u. W. P. NEUMANN aus gereinigtem Bienengift gewonnen. Wenn nicht besonders angegeben, wurde dieses Material benutzt.

4. Fraktion II von Bienengift (F II): papierelektrophoretisch nach NEUMANN u. HABERMANN (1) aus gereinigtem Gift dargestellt.

5. Gifte von Naja nigricollis und Vipera ammodytes: Von der Firma Basilisk, Basel, bezogen; Toxicität s. bei HABERMANN (5), papierelektrophoretische Auftrennung bei HABERMANN u. NEUMANN (2).

6. Lysocithin: Nach MAGISTRIS aus mit Bienengift vorbehandeltem Eigelb dargestellt, chromatographisch nach HABERMANN (6) an der Aluminiumoxydsäule von ninhydrinpositiven und cadmiumhaltigen Beimischungen befreit.

2. Vergleich der Dosiswirkungskurven von nativem und gereinigtem Bienengift, Fraktion I, Lysocithin und quarternären Ammoniumbasen

Zunächst mußte geprüft werden, ob sich das von uns benutzte, gereinigte Gift in seinem hämolytischen Vermögen wie natives Trockengift verhielt. Wie Abb. 1 zeigt, ist dies der Fall. Auf die Steilheit der Dosiswirkungskurve von gereinigtem Bienengift wurde bereits früher hingewiesen, ferner darauf, daß die Resistenzverteilung der Erythrocyten, welche ja mittels der Dosiswirkungsbeziehung erfaßt werden soll, gegenüber chromatographisch oder papierelektrophoretisch gewonnener F I erheblich breiter ist als gegenüber Bienengesamtgift (NEUMANN u. HABERMANN (1)). F I besitzt die flachste Dosiswirkungskurve sämtlicher bisher von uns geprüfter Hämolytica und ist unter unseren Bedingungen erheblich aktiver als quarternäre Ammoniumbasen, wie Lysocithin, Zephirol oder Quartamon und (bei Bezug auf den 50%-Wert) etwa so wirksam wie Digitonin. Allerdings ist die Dosiswirkungskurve von Digitonin ebenso wie die der anderen Hämolytica erheblich steiler als die von F I (vgl. z. B. Abb. 1 mit Abb. 8). Digitonin führte auch in unseren Versuchen zu der von JUNG u. SCHWARTZKOPFF beschriebenen Zonenbildung (Abb. 8), die wir bei den anderen Substanzen niemals beobachteten. Wir möchten den geringen Anstiegswinkel der F I-Kurve darauf zurückführen, daß sie die Resultante der gemeinsamen Wirkung verschiedener, in der chemisch sicherlich nicht einheitlichen Fraktion vereinigter Hämolytica darstellt. Die eben angestellten Vergleiche gelten unter den von uns eingehaltenen Reaktionsbedingungen. Änderung der Temperatur oder des ionalen Milieus würden zu starker Verschiebung der Aktivitätsrelationen führen; bereits einfaches Stehenlassen ändert die Wirksamkeit

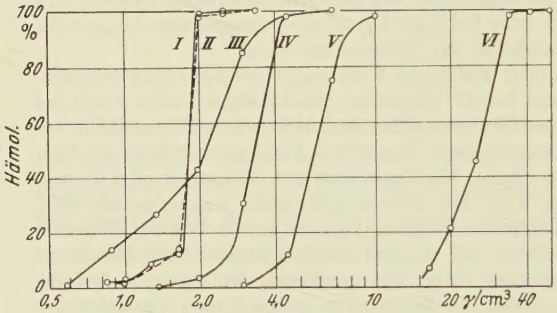


Abb. 1. Vergleich der Dosis-Wirkungskurven verschiedener Hämolytica. Ordinate: Hämolyse (%). Abszisse: Giftkonzentration (γ/cm³). Standardbedingungen (s. Methodik). *I* natives Bienengift; *II* gereinigtes Bienengift; *III* Fraktion I; *IV* Quartamon; *V* Zephirol; *VI* Naja nigricollis-Gift. Für *I*, *II* und *VI* einerseits, *III*, *IV* und *V* andererseits wurden Erythrocyten verschiedener Spender verwendet

von Fraktion I (s. unten) und damit auch die von Gesamtgift und gereinigtem Gift.

3. Zur Beteiligung des indirekt hämolysierenden Prinzips an der direkten Bienengift-Hämolyse

Die unterschiedliche Resistenzverteilung der Erythrocyten gegenüber Bienengift und F I veranlaßte die Frage, ob im Laufe der Aufarbeitung des Giftes ein zweiter, in die Hämolyse eingreifender Faktor entfernt wurde, oder ob F I chemisch verändert wurde. Da das letztere in Anbetracht der äußerst schonenden chromatographischen Darstellung und der vollkommen gleichsinnigen Veränderung der Hämolysekurven bei chromatographischer und elektrophoretischer Gewinnung unwahrscheinlich erschien, suchten wir nach einem „zweiten Faktor" der direkten Bienengift-Hämolyse. Die sog. Fraktion 0 schied von vornherein aus, da die elektrophoretisch gewonnene Fraktion I, welche noch Teile von Fraktion 0 enthielt, eine prinzipiell gleiche Dosiswirkungskurve wie ein chromatographisch gewonnenes, von Fraktion 0 freies Präparat ergab. Es war also besonders an die phospholipase- und hyaluronidasehaltige Fraktion II zu denken.

Da wir zunächst keine vollkommen von F I freie F II besaßen, verwendeten wir als Fermentdonatoren eine Reihe von Schlangengiften, nämlich Naja nigricollis-, Naja naja- und Vipera ammodytes-Gift. Das erstgenannte enthält ein direkt hämolysierendes Prinzip, das zweite (in erheblich geringerem Maße) ebenfalls, während Ammodytesgift hiervon frei ist (Habermann (6)). Eine Resynthese der steilen Bienengiftkurve gelang uns jedoch durch Zusatz dieser Gifte zu F I nicht. Zwar wurde durch Zugabe von Naja naja-Gift und noch mehr durch Naja nigricollis-Gift das Ausmaß der F I-Hämolyse erheblich verstärkt, die Dosiswirkungskurve wurde auch steiler, insbesondere unter Nigricollisgift. Jedoch ist bei diesen beiden Giften immer noch der Einwand möglich, daß ihr direkt hämolytisches Prinzip dafür verantwortlich sein könnte. Zusatz von Ammodytesgift rief nämlich keine Aktivierung der F I-Wirkung hervor, eher eine geringe Hemmung. Auch die Lysocithinhämolyse, welche wir vergleichsweise mituntersuchten, wurde durch Naja naja-Gift ohne Steilerwerden der Kurve relativ wenig, durch Ammodytesgift nur angedeutet verstärkt.

Diese Ergebnisse schließen jedoch eine Beteiligung der Phospholipase in F II an der direkten Hämolyse nicht aus. Bebrütet man nämlich isolierte, gewaschene Erythrocytenstromata mit dem (direkthämolytisch unwirksamen) Ammodytesgift, so lassen sich mit dem Reaktionsgemisch sekundär zugesetzte intakte Erythrocyten hämolysieren.

2,2 cm³ Erythrocytenmasse wurden mit 22 cm³ Wasser bei Zimmertemperatur hämolysiert, die Stromata mit einer hochtourigen Zentrifuge (Pirouette) bei 12000

U/min = 17000 g abzentrifugiert und 3mal mit Wasser gewaschen. Nach 2tägiger Aufbewahrung im Eisschrank wurden sie mit Wasser auf 10,1 cm³ aufgefüllt. Ansätze: 1 cm³ Ammodytesgift in Puffer 1:1000, 1:4000 usw. bis 1:4096000 +1 cm³ Suspension der Erythrocytenschatten wurden 1 Std bei 37° gehalten, anschließend 2 cm³ einer 1,2%igen Erythrocytensuspension in Puffer zugegeben. Nun wurde 40 min bei 37° inkubiert und wie üblich zentrifugiert. Die Kontrollen wurden in gleicher Weise angesetzt. In die Kontrollreihe I kam statt der Erythrocytenschattensuspension 1 cm³ Wasser, in die Kontrollreihe II statt Ammodytesgift Pufferlösung.

In den Röhrchen mit Schattensuspension und Ammodytesgift (Konzentration 1:1000, 1:4000 und 1:16000) war nahezu totale Hämolyse eingetreten, in den übrigen Ansätzen sowie in den Kontrollreihen dagegen nicht.

Dieser Versuch beweist, daß in den Stromata der menschlichen Erythrocyten sich durch Schlangengift in Lysoverbindungen überführbares Material befindet (Hauptversuch), ferner, daß dieses bei intakten Erythrocyten in unangreifbarer Form eingebaut sein muß (Kontrollreihe I); es liegt nahe, dabei an Phospholipoide zu denken.

Die Dosiswirkungskurve von gereinigtem Bienengift läßt sich nicht nur durch Entfernung von F II, sondern auch durch 15 min dauerndes Erhitzen mit n/20 Sodalösung auf 98°C abflachen. Durch diese Behandlung wird Phospholipase A (NEUMANN u. HABERMANN (2)) praktisch vollständig, F I dagegen (s. unten) nur zum kleineren Teil inaktiviert. Dieser Versuch beweist, daß an der Bienengifthämolyse ein im Alkalischen relativ thermolabiler Faktor (möglicherweise Phospholipase A) und ein im Alkalischen relativ thermostabiles Prinzip (F I) beteiligt ist. Die Aktivität des mit Sodalösung erhitzten Giftes betrug im Bereich der 50%-Hämolyse rund $^3/_4$ der Wirksamkeit von erhitzter F I und rund $^1/_4$ von der des Ausgangsgiftes.

Schließlich gelang es durch Zusatz einer papierelektrophoretisch gewonnenen, weitgehend reinen und hochaktiven F II zu F I die steile Wirkungskurve des Ausgangsgiftes zu resynthetisieren (Abb. 2). Das benutzte Präparat besaß etwa die 4fache Phospholipaseaktivität und nur 10% der direkt hämolytischen Aktivität des gereinigten Giftes. Zusatz von nur 0,07 γ/cm³ dieser Fraktion war bereits an der Dosiswirkungskurve eindeutig zu erkennen. Es ist also aus den angeführten Versuchen zu schließen, daß neben F I ein in F II enthaltener Faktor (höchstwahrscheinlich Phospholipase A) an der direkten Hämolyse durch gereinigtes Bienengift beteiligt ist und daß die Wirkung dieses Faktors nicht durch Schlangengesamtgift ersetzt werden kann. Bienengiftphospholipase scheint sich auch in anderer Hinsicht von den in Schlangengift enthaltenen analog wirkenden Fermenten zu unterscheiden (HABERMANN u. NEUMANN (2), HABERMANN (6)[1]).

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Die „Resynthese" der Dosiswirkungskurve erfolgt auch bei Kombination von FI und gereinigter Phospholipase (HABERMANN, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 538 (1957)).

Übrigens wird auch durch Zusatz von gereinigtem Bienengift und von Lysocithin zu F I die Hämolyse mehr als additiv gesteigert. Im Falle des gereinigten Giftes läßt sich dies auf die in ihm enthaltene F II zurückführen; beim Lysocithin muß eine von F I verschiedenartige, deren Effekt gewissermaßen potenzierende Wirkung angenommen werden.

4. Reaktionsbedingungen der Bienengift- und F I-Hämolyse

a) Zeitlicher Ablauf

Wie schon Neumann, Habermann u. Hansen fanden, ist die Bienengifthämolyse in bestimmten Konzentrationsbereichen auch nach Stunden noch nicht vollständig abgeschlossen. Mit der jetzt von uns benutz-

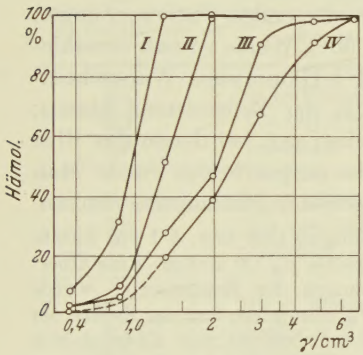


Abb. 2

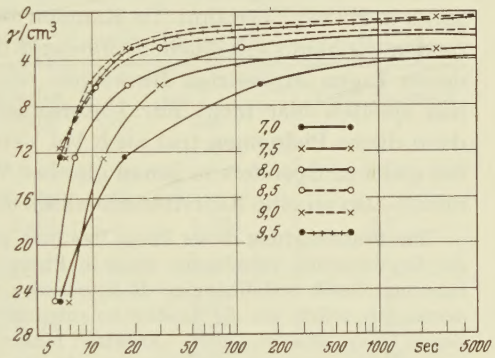


Abb. 3

Abb. 2. Resynthese der Bienengiftkurve durch Kombination elektrophoretischer Fraktion II und chromatographischer Fraktion I. Abszisse: γ/cm³ Fraktion I. Ordinate: Hämolyse (%). Zusätze von Fraktion II: *I* = 1,25 γ/cm³, *II* = 0,312 γ/cm³, *III* = 0,078 γ/cm³, *IV* = 0

Abb. 3. Zeit-Verdünnungskurve der Fraktion I — Hämolyse bei verschiedenem p_H. Ordinate: γ/cm³ Fraktion I. Abszisse: Zeit (in Sekunden) bis zur kompletten Hämolyse. Ansatz: 0,5 cm³ F I in physiologischer Kochsalzlösung + 0,366 cm³ Veronal-Salzsäurepuffer + 0,133 cm³ physiologische Kochsalzlösung + 1 cm³ 1,2%ige Erythrocytensuspension. Reaktionstemperatur 40°

ten, wesentlich verbesserten Methodik ließ sich der Verlauf im Bereich der angewandten Einwirkungszeiten bestätigen. Gelegentlich bemerkte man bei zunehmender Versuchsdauer zusätzlich ein Steilerwerden der

Tabelle 1. *Zeitlicher Ablauf der Hämolyse durch F I, gereinigtes Bienengift und Lysocithin* (Ansätze unter Standardbedingungen p_H 7,0)

Inkubationszeit (min)	30	60	120	240
D_{50} F I (γ/cm³)	3,0	2,7	2,5	2,3
D_{50} Lysocithin (γ/cm³)	6,6	6,4	6,2	5,8

Kurve. Die F I-Hämolyse näherte sich im Vergleich zu der durch Gesamtgift etwas schneller dem Endwert. Sie war unter unseren Bedingungen sowohl bei p_H 7,0 als auch bei p_H 9,2 nach 30 min weitgehend

abgeschlossen (vgl. Tabelle 1, Abb. 3, 6a, 6b). Der zeitliche Ablauf der Hämolyse durch Gifte verschiedener Colubridenarten unterscheidet sich von der durch Bienengift in wesentlichen Punkten, worauf wir in einer späteren Mitteilung noch zurückkommen werden.

Etwas schneller noch als die F I-Hämolyse erreicht die durch Lysocithin herbeigeführte ihren Endwert, wie dies auch schon nach Versuchen von Gorter u. Hermans sowie Collier (1, 2) zu erwarten war. Die zeitliche Änderung des Ausmaßes der Bienengift- und F I-Hämolyse ist jedoch nicht allein von der eigentlichen Reaktion zwischen Hämolysin und Erythrocyt abhängig, sondern auch von zeitlichen Veränderungen der beiden Partner. Der Einfluß gelegentlich zu beobachtender Resistenzschwankungen der Erythrocyten wurde bereits von Neumann, Habermann u. Hansen erwähnt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen fanden wir häufig erhebliche Differenzen der 50%-Werte von an verschiedenen Tagen angesetzten Bienengift- oder F I-Hämolysen. Wahrscheinlich spielten hier nicht nur Unterschiede in der Zellresistenz hinein; denn dieses Phänomen trat auch bei Versuchen auf, bei denen das Blut des gleichen Spenders in genau gleicher Weise aufgearbeitet wurde. Man mußte also an eine Aktivitätsabnahme des gelösten Hämolysins denken.

Zur Beantwortung dieser Frage ließ man gereinigtes Gift bzw. F I vor Zusatz der Erythrocyten verschieden lange in Phosphatpuffer p_H 7,0 stehen. Eine Überlagerung durch zeitabhängige Resistenzschwankungen der Erythrocyten wurde vermieden, indem wir die Ansätze so aufeinander abstimmten, daß der Zusatz der Zellen zu verschieden „alten" Ansätzen binnen 26 min beendet war. Es ergab sich in der Regel eine eindeutige Abnahme der Wirksamkeit der Lösungen von Bienengift und F I in Abhängigkeit von der Zeit. Lösungen von Digitonin und Nigricollisgift dagegen behielten binnen 4 Std ihre Aktivität konstant bei; dies spricht gleichzeitig — vorausgesetzt, daß das Resistenzverhältnis gegenüber mehreren Hämolyticis konstant ist — dafür, daß die Stabilität unserer Erythrocytensuspension sich nicht geändert hat. Es kann ferner nicht eine Änderung der Phospholipaseaktivität von Bienengift für den im Vergleich zu F I stärkeren Aktivitätsabfall verantwortlich gemacht werden; denn Kontrollen mit dem Dotterkoagulationstest zeigten sowohl in Phosphat- als auch in Veronalpuffer keine signifikante Abnahme der koagulationshemmenden Fähigkeit binnen 4 Std.

Die Aktivitätsabnahme ist in Gegenwart von Cellophanhäutchen erheblich gesteigert. Diese sind also beim Arbeiten mit tierischen Giften, insbesondere Bienengift, unbedingt zu vermeiden.

Um trotz dieser Unsicherheitsfaktoren zu verläßlichen Vergleichswerten zu gelangen, wurde das betr. Hämolyticum täglich nur einmal gelöst und bei dem überwiegenden Teil unserer Versuche nur das Blut eines einzigen Spenders verwendet. Außerdem liefen die Versuche einander und der Kontrolle zeitlich parallel; es wurden z. B. sämtliche Ansätze mit der Giftkonzentration 1:100000 gleichzeitig angesetzt. Dadurch wurden die Werte für gleiche Konzentrationen strikt vergleichbar; es könnten jedoch durch dieses Verfahren Verzerrungen in der Form der Dosiswirkungskurve auftreten. Wir suchten diese auf 2 Arten zu eliminieren; einerseits durch Vergleich mit Kurven, welche ohne zeitliche Verschiebung gewonnen waren, andererseits dadurch, daß wir sämtliche Hämolyseversuche eines Arbeitstages binnen ca. 30 min ansetzten.

b) pH-Abhängigkeit

Die F I-Hämolyse ist sehr stark pH-abhängig. Während im sauren Bereich die Fähigkeit zur Lyse sehr gering ist, nimmt sie im Alkalischen stark zu und erreicht bei pH 9—9,5 ihr Maximum; noch weiter im Alkalischen stört die sich entwickelnde Spontanhämolyse. Vielleicht hämolysiert F I, deren isoelektrischer Punkt jenseits von pH 10 liegt, nur als freie Base, während die in saurer Lösung vorliegende ionisierte Form weniger oder gar nicht wirksam ist. Beim Lysocithin liegt nach übereinstimmenden Angaben von Wilbur u. Collier sowie Collier (1, 2) das pH-Optimum um pH 6 (Tabelle 2, Abb. 3).

Tabelle 2. *pH-Abhängigkeit der F I-Hämolyse*

pH des verwendeten Puffers	Art des Puffers	D_{50} (γ/cm³)	pH bei Totalhämolyse
5,4	m/15 Phosphatpuffer,	ca. 7	nicht gemessen
6,2	1:4 mit 0,85% NaCl	3,4	
7,0	verdünnt	1,8	
7,8	m/15 Phosphatpuffer, 1:3 mit 0,85% NaCl verdünnt	1,02	7,7
7,8	0,1 m Veronal-HCl-	0,97	7,7
8,45	Puffer, 1:3 mit NaCl	0,70	8,35
9,0	verdünnt	0,62	8,65
9,35		0,52	8,95

Anmerkung: Bei keinem der angewandten pH-Werte trat Spontanhämolyse ein. Während der Hämolyse kam es in den alkalischen Ansätzen zur pH-Erniedrigung. Versuchsausführung: Standardbedingungen.

c) Osmotische Einflüsse

Nach Wilbrandt lassen sich die Hämolysen in osmotische und nichtosmotische einteilen. Der erstgenannte Typ liegt vor, wenn die Resistenz der mit dem Hämolyticum behandelten, aber scheinbar noch intakten Erythrocyten gegenüber hypotonischem Milieu vermindert ist. Häufig besteht eine Kombination zwischen osmotischem und nichtosmotischem Typ. Die Bienengifthämolyse von Rinderblut rechnet Wilbrandt zum erstgenannten, ebenso Collier (2) die Lysocithinhämolyse von Kaninchenblut.

Wir prüften die Beziehungen zwischen osmotischem Druck und F I-Wirkung (und im Vergleich dazu auch Digitonin- und Lysocithinwirkung) auf zweierlei Weise. Zunächst wurde die Hämolyse bei pH 7,0 auf übliche Art, aber unter Variation der Tonicität des Milieus ausgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3. Unter diesen Bedingungen hängt also die

F I-Hämolyse stärker als die Lysocithinhämolyse, die Digitoninhämolyse dagegen, wie schon JUNG u. BÖHM beschrieben, nicht vom osmotischen Druck im Ansatz ab. Gleichzeitige Kontrolle der Zeitabhängig-

Tabelle 3. *Osmotischer Druck und F I-, Lysocithin- und Digitoninhämolyse*

Tonicität	D_{50} (γ/cm³)			
	F I		Lysocithin[3]	Digitonin[3]
	p_H 7,0[1]	p_H 9,2[2]		
0,76	1,25	0,36	4,9	1,72
1,00	1,50	0,41	5,5	1,75
1,38	1,75	0,51	6,1	1,75

[1] *Ansatz:* 2,5 cm³ Hämolyticum in Wasser + 2,5 cm³ NaCl-Lösung + 5 cm³ 1,2%ige Erythrocytensuspension in Phosphatpuffer (p_H 7,0, 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt). 4 Std bei 37°.

[2] *Ansatz* wie [1], aber Veronalpuffer p_H 9,2.

[3] *Ansatz* wie [1], aber Phosphatpuffer p_H 7,0 (1:4 mit physiol. NaCl verdünnt).

keit ergab, daß die Ansätze bei erniedrigtem osmotischen Druck nicht nur bis zu niedrigeren F I-Konzentrationen, sondern auch schneller hämolysierten.

Bei der 2. Versuchsanordnung wurden in Anlehnung an die Technik von WILBRANDT die Erythrocyten zunächst in isotonischem Milieu 40 min bei 37° mit dem Hämolyticum inkubiert (5 cm³ 6%ige Erythrocytensuspension + 5 cm³ Hämolyticum, beides in phosphatgepufferter (p_H 7,0) isotonischer Kochsalzlösung); dann wurden 0,5 cm³ entnommen und zu 9,5 cm³ einer Pufferverdünnung variabler Tonicität gegeben, nochmals 40 min bei 37° inkubiert und schließlich zentrifugiert.

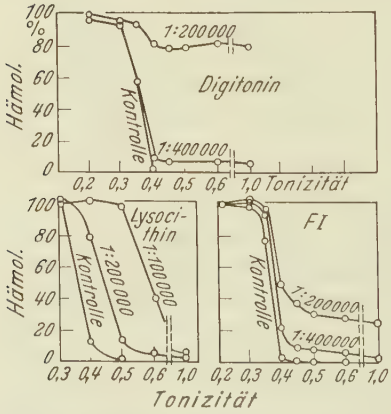


Abb. 4. Osmotische Resistenz vorbehandelter Erythrocyten. Ordinate: Hämolyse (%). Abszisse: Tonicität. Ansätze: s. Text

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Abb. 4. Während der osmotische Typ der Lysocithinhämolyse wie bei COLLIER (2) eindeutig hervortrat, lag bei F I eine starke nichtosmotische Komponente vor, ebenso beim Digitonin. Auch nach Vorbebrütung bei p_H 9,2 (Veronalpuffer) ergab F I den gleichen, vorwiegend nichtosmotischen Kurventyp. Allerdings ist damit nur etwas über die *bleibenden* Erythrocytenveränderungen gesagt; die Beeinflussung des eigentlichen Hämolysevorganges läßt sich wohl durch die 1. Versuchsanordnung

besser demonstrieren. Aber auch sie gibt nicht darüber Auskunft, ob der osmotische Effekt an der Erythrocytenwand (Quellung oder Entquellung der Membran) oder im Erythrocyteninhalt (Osmometer-Effekt) oder an beiden zur Geltung kommt.

d) Einfluß der Erythrocytenkonzentration

Die Variation der Erythrocytenzahl läßt gewisse Schlüsse auf den Verbrauch von Hämolyticum während der Lyse zu. Da es uns interessierte, ob die lytisch wirksame Substanz bereits an intakte Erythrocyten adsorbiert wird und ob sie evtl. während deren Auflösung verbraucht wird, variierten wir die Zellkonzentration auf 2 verschiedene Weisen. Zunächst wurden zu gleichen Lysinkonzentrationen verschiedene Erythrocytenkonzentrationen zugegeben (3 cm³ Lysin in verdünntem Phosphatpuffer + 3 cm³ Erythrocytensuspension (12, 6, 3 bzw. 1,5%ig); 40 min bei 37°; anschließend zentrifugiert).

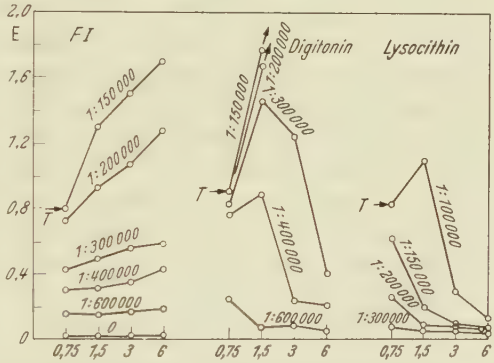


Abb. 5. Hämoglobinfreisetzung und Zellkonzentration. Ordinate: Extinktion (Schichtdicke 1 cm, Filter S 55). Abszisse: Erythrocytenkonzentration (%). Ansätze: s. Text. *T* Totalhämolyse der 0,75%igen Suspension

Wie Abb. 5 zeigt, setzen hohe Lysocithin- und auch Digitoninkonzentrationen aus steigenden Zellkonzentrationen zunächst mehr Hämoglobin frei; erhöht man die Zellkonzentration weiter, so fällt die Menge des freigesetzten Hämoglobins wieder ab. Niedrige Digitonin- und vor allem Lysocithinkonzentrationen werden dagegen durch steigende Zellkonzentrationen inaktiviert. Die Gesamtkurve ist für beide Hämolytica am besten durch Überlagerung zweier Effekte verständlich: der Resistenzverteilung des Erythrocytenkollektivs und der Bindung durch intakte Zellen. Die absolute Menge des durch F I freigesetzten Hämoglobins dagegen nimmt über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich mit steigender Zellkonzentration zu. Die Hemmung der Lysocithin- und Digitoninwirkung durch steigende Zellmengen könnte auf zweierlei Art gedeutet werden, einerseits als Adsorption an die im Überschuß zugesetzten Erythrocyten; andererseits könnte ein Hämolyseinhibitor, ähnlich dem von Ponder für die Saponinhämolyse beschriebenen, aus den Erythrocyten ausgetreten sein. Diese zweite Möglichkeit schlossen wir für Fraktion I und Lysocithin durch den folgenden Versuch aus:

2,4 cm³ 3mal gewaschener Erythrocytenmasse wurden mit der 12fachen Menge Puffer p_H 7,0 40 min bei 37° gehalten; dann wurde 3 min bei 3200 U/min zentrifugiert; das Überstehende wurde gesammelt, die Blutzellen einmal mit Kochsalzlösung nachgewaschen und als 1,2%ige Suspension in Puffer aufgeschwemmt. Falls die Erythrocyten bei Bebrütung einen Inhibitor abgaben, sollte das Überstehende die Hämolyse hemmen. Ansätze: 1 cm³ Hämolyticum in Puffer + 1 cm³ Puffer bzw. Überstehendes + 2 cm³ Erythrocytensuspension in Puffer.

Die F I- und die Lysocithinhämolyse wurden unter diesen Bedingungen durch das Überstehende nicht gehemmt. Die Minderung der Digitoninwirkung war nur gering, aber in einem 2. Versuch reproduzierbar. Die Minderung der Aktivität durch Erythrocytenzusatz kann im Fall der Lysocithinhämolyse also nicht, im Fall der Digitoninhämolyse nur zum Teil durch Substanzaustritt erklärt werden, sie muß vielmehr auf eine Bindung an die Zellen selbst zurückgeführt werden. Eine geringe Bindung von F I könnte dem Nachweis entgangen sein, denn nach der üblichen Anschauung ist die Dosiswirkungsbeziehung der Ausdruck einer Resistenzverteilung. Es müßten demnach in einem größeren Zellkollektiv auch mehr besonders stark F I-empfindliche Zellen vorhanden sein, und es sollte der Hämolysegrad auch bei Anwendung kleiner F I-Konzentrationen von der im Ansatz vorhandenen Zellzahl abhängig werden. Dies ist zwar, wie Abb. 5 zeigt, in geringem Maße der Fall. Es könnten sich aber die Effekte — Adsorption und breite Resistenzkurve - gegenseitig aufheben und sich dadurch dem Nachweis entziehen. Die Frage, ob eine schwer reversible Adsorption von F I an intakte Erythrocyten eintritt, muß also noch offen bleiben. Eine etwa vorhandene Adsorption dürfte wohl sehr viel geringer sein als bei Digitonin und Lysocithin.

Die älteren Versuche von Gorter u. Hermans über die Lysocithinhämolyse sind für unsere Fragestellung nicht verwendbar, da diese Autoren die Abhängigkeit der total-hämolysierenden Lysocithinkonzentration von der Zellmenge prüften. Nach Collier (2) fällt der auf die zu 50% hämolysierte Zelle berechnete Lysocithinverbrauch in Anwesenheit steigender Zellkonzentrationen ab. Unsere Versuchsbedingungen unterscheiden sich grundsätzlich von den seinen durch Anwendung höherer Temperatur. Überdies gibt Collier jeweils nur einen Punkt, nämlich die 50%-Hämolyse an. Es muß aber, will man zu einer gültigen Aussage gelangen, der Gesamtverlauf der Kurve berücksichtigt werden, sonst läuft man Gefahr, durch das unterschiedliche Verhalten des Erythrocytenkollektivs gegenüber niedrigen bzw. höheren Lysocithinkonzentrationen getäuscht zu werden.

Die Hämolyse durch gereinigtes Bienengift verhielt sich bei Variation der Erythrocytenzahl wie die durch Lysocithin, nicht wie die durch F I. Auch dies spricht dafür, daß bei der direkten Hämolyse durch Bienengift ein lysocithinartiger Faktor eine Rolle spielt.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurden die Blutkörperchen des Ansatzes bei nahezu konstanter Lysinkonzentration in zeitlichen Intervallen durch frische Zellen ersetzt.

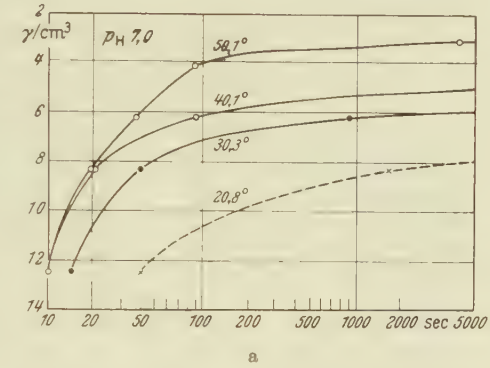
Zunächst gab man zu 38 cm³ Lysin in verdünntem Phosphatpuffer 2 cm³ Erythrocytensuspension (4 Mill. Zellen/mm³) und hielt 40 min bei 37°. Nach dem Zentri-

fugieren wurden 28,5 cm³ der Lösung mit 1,5 cm³ frischer Erythrocytensuspension inkubiert, zentrifugiert, vom Überstehenden 19 cm³ mit 1 cm³ Suspension inkubiert, zentrifugiert und schließlich vom Überstehenden 9,5 cm³ mit 0,5 cm³ Erythrocytensuspension inkubiert und zentrifugiert. Die Lysinkonzentration fiel bei dieser Anordnung von Ansatz zu Ansatz um 5%, insgesamt vom ersten bis zum letzten Ansatz um 13%. Die Anfangskonzentration an F I war 10 γ/cm³, an Digitonin 10 γ/cm³, an Lysocithin 20 γ/cm³.

Alle 3 Substanzen lysierten unter diesen Bedingungen nur bei erstmaliger Erythrocytenzugabe; anschließend waren sie völlig inaktiv. Welche Komponenten der Erythrocyten diese Hemmung hervorriefen, wird weiter unten erläutert werden.

e) Temperaturabhängigkeit der F I-, Lysocithin- und Digitoninhämolyse

Das Ausmaß der F I-Hämolyse steigt von +2° bis 41,6° mit der Temperatur; zwischen 20° und 35° ist der Anstieg annähernd linear. Ganz anders als F I verhält sich Lysocithin (Collier (1)) bei verschiedener Temperatur. Ebenso wie bei Digitonin (Jung u. Böhm) verläuft die Hämolyse bei Eisschranktemperatur zwar langsamer, erreicht aber erheblich höhere Grade (Tabelle 4). Über den zeitlichen Ablauf bei Variation der Temperatur gibt Abb. 6a u. b Aufschluß.



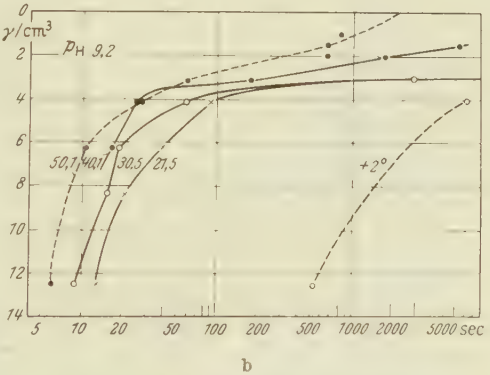


Abb. 6 a u. b. Zeit-Verdünnungskurve der Fraktion I-Hämolyse bei verschiedener Temperatur. Ordinate: γ/cm³ Fraktion I. Abszisse: Zeit (in Sekunden) bis zur kompletten Hämolyse. Ansatz: 2 cm³ Fraktion I in Veronal-Salzsäurepuffer + 2 cm³ 1,2%ige Erythrocytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung

Tabelle 4. *Temperaturabhängigkeit der Hämolyse durch F I, Lysocithin und Digitonin*
(Versuchsansatz: Standardbedingungen)

	F I		Lysocithin		Digitonin	
17 Std bei °C	37	8	37	8	37	8
D_{50} (γ/cm³)	3,1	>8	7,3	3,05	3,9	1,03

5. Eingriffe, welche zur Hemmung der Bienengift-, F I- und Lysocithinhämolyse führen

a) Einfluß von Bestandteilen des Blutes

Die hemmende Wirkung von Serum auf die Bienengifthämolyse ist schon lange bekannt (LANGER), ebenso die Inaktivierung der Lysocithinwirkung durch Serum (GROSSE u. TAUBÖCK) und Cholesterin (DELEZENNE u. FOURNEAU). Nach unseren Versuchen ist auch die F I-Hämolyse

Tabelle 5. *Plasmabestandteile und F I-Hämolyse*
(Versuchsansätze: Standardbedingungen)

Zugesetzte Substanz (Endkonzentration)	D_{50} (γ/cm³)	Verhältniszahl	Bemerkungen
Kontrolle (Puffer)	2,8	1,00	
Cholesterin 1:80000	2,8	1,0	trübe[1]
Rinder-γ-Globulin 1:1000	2,5	1,12	[2]
Rinderalbumin „rein" 1:1000	3,6	0,78	[2]
Kontrolle (Puffer)	2,8	1,00	
Humanalbumin 1:1000	2,7	1,04	[2]
Fibrinogen 1:1000	2,7	1,04	[2]
Kontrolle (Puffer)	2,75	1,00	
Lecithin 1:4000	>50	<0,055	[3]
Lecithin 1:40000	4,6	0,60	
Lecithin 1:400000	2,75	1,00	
Lecithin 1:4000000	2,75	1,00	
Kontrolle (Puffer)	1,8	1,00	
Humanplasma $^1/_{32}$ verdünnt	ca. 7,8	ca. 0,23	[4]
Thrombocid 1:40000 (statt Heparin)	>10	<0,18	[5]

[1] Cholesterin 1:100 in warmem Methanol gelöst; dann mit Puffer um das 200fache verdünnt.

[2] Präparate der Behring-Werke, Marburg.

[3] Nach PANGBORN hergestelltes Lecithin, durch Schütteln mit Pufferlösung emulgiert.

[4] 4 Teile Venenblut + 1 Teil 3,8% Natriumcitrat; 3 min bei 3200 U/min zentrifugiert.

[5] Präparat der Firma Benend, München.

durch Plasma stark hemmbar (Tabelle 5). Cholesterin spielt hierbei im Gegensatz zur Digitonin- und Lysocithinhämolyse (vgl. Tabelle 6) keine wesentliche Rolle. Es vermag auch die Hämolyse durch gereinigtes Bienengift nur wenig abzuschwächen; dabei dürften Adsorptionseffekte in der schwach trüben Lösung bzw. eine Hemmung des durch die Phospholipase A intermediär gebildeten Lysocithins im Spiele sein. Auch Humanalbumin, Fibrinogen und Rinder-γ-Globulin sind ohne Einfluß auf F I; Rinderalbumin hemmt mäßig (Tabelle 5). Möglicherweise beruht die neuerdings auch von GASTPAR u. SEITZ betonte Hemmwirkung von Al-

bumin gegenüber der Hämolyse durch Bienengesamtgift auf Beimischungen, z. B. Glykoproteiden, denn Polysaccharidester sind, wie weiter unten noch mitgeteilt wird, sehr starke Inhibitoren der Bienengift- und F I-Wirkung.

Auch Bestandteile der Erythrocyten beeinflussen die Bienengift- und F I-Wirkung deutlich, wie sich mittels folgender Versuchsanordnung ergab:

1,2 cm³ Erythrocytenmasse wurden mit 12 cm³ m/150 Phosphatpuffer p_H 7,0 10 min bei 37° hämolysiert, 10 min bei 12000 U/min (= 17000 g) zentrifugiert, das

Tabelle 6. *Cholesterin und Lecithin und Hämolyse durch Bienengift, Lysocithin oder Digitonin*

Lysin	Zugesetzte Substanz (Endkonzentration)	D_{50} (γ/cm³)	Verhältniszahl
Gereinigtes Bienengift	Puffer	1,85	1,00
	Cholesterin		
	1:100000	2,30	0,80 (trübe)
	1:500000	2,20	0,84
	Puffer	4,1	1,0
Lysocithin	Cholesterin		
	1:100000	>50	<0,08
	1:500000	6,25	0,66
	Puffer	4,0	1,00
Lysocithin	Lecithin[1]		
	1:10000	ca. 12	ca. 0,30
	1:100000	5,6	0,71
	Puffer	2,2	1,00
Digitonin	Lecithin		
	1:10000	2,3	0,96
	1:100000	2,05	1,07

[1] In unserem nach PANGBORN hergestellten Lecithin war bei einer Konzentration 1:50 mit Digitonin kein Niederschlag erzielbar, während Cholesterin 1:16000 in einer 1%igen Lecithinlösung noch nachweisbar war. Die Hemmung der Lysocithinhämolyse kann nicht durch Verunreinigung unseres Lecithinpräparates mit Cholesterin erklärt werden.

Überstehende zur Beseitigung von Resten noch 2mal auf gleiche Weise zentrifugiert, der Bodensatz 2mal mit je 12 cm³ hypotonischer Pufferlösung gewaschen; er war dann nahezu farblos. Das Überstehende wurde bis zum gewünschten Extinktionsgrad mit isotonischer Pufferlösung verdünnt, der Bodensatz in 24 cm³ einer m/27 Pufferlösung suspendiert.

Nun wurden je 2 cm³ F I bzw. gereinigtes Bienengift 1:25000, 1:50000, 1:100000 1:200000 und 1:400000 mit je 2 cm³ Bodensatz versetzt und 20 min bei ca. 37° inkubiert. Ebenso wurde eine Kontrollreihe behandelt, in welche statt der Sediment-

präparation Pufferverdünnung gegeben wurde. Schließlich wurden noch giftfreie Kontrollen angesetzt. Nach der Einwirkungszeit wurden 4 cm³ 1,2%iger Erythrocytensuspension zugefügt und der Ansatz 40 min bei 37° gehalten, zentrifugiert und im Unicamspektrophotometer die Extinktion bei 578 mμ gemessen.

Wie Tabelle 7 zeigt, wird die F I-Hämolyse durch das Sediment stark gehemmt, die durch gereinigtes Gift dagegen stark gefördert. In weiteren, analog durchgeführten Versuchen ergab sich eine starke Inaktivierung auch von Lysocithin durch das Sediment.

Nunmehr erhob sich die Frage, inwieweit das nichtzentrifugierbare Material der Hämolysate die Hämolyse beeinflußt. Bei den ersten Versuchen (HABERMANN (4)) glaubten wir eine gewisse Hemmwirkung gegenüber F I und Bienengift nachgewiesen

Tabelle 7. *Beeinflussung der Bienengift- und FI-Hämolyse durch Erythrocytenstromata* (Ansätze s. Text)

Lysin-Endkonzentration (γ/cm³)	Prozentuale Hämolyse durch			
	ger. Bienengift + Puffer	ger. Bienengift + Sediment	F I + Puffer	F I + Sediment
10	—	—	100	100
5	100	100	100	59
2,5	99	99	52	1
1,25	—	99	15	2
0,625	17	99	3	2
0,313	2	7	—	—

zu haben. In der Folge fanden wir jedoch unter Benutzung objektiver photoelektrischer Verfahren, daß diese dadurch vorgetäuscht war, daß die Hämoglobin-Eichkurve bei den damals verwendeten hohen Konzentrationen nicht mehr linear verlief. Hämoglobinmengen, welche in einer Schichtdicke von 1 cm bei 576 mμ eine Extinktion von 0,456 hervorriefen, hemmten sowohl die F I- als auch die Lysocithinhämolyse bei den jetzt angestellten Versuchen nur angedeutet.

b) Chemische Einflüsse

Die Phospholipase A von Bienengift wird nach NEUMANN u. HABERMANN (2), HABERMANN u. NEUMANN (1) durch verschiedene Substanzen (Kaliumcyanid, Calcium, Aminosäuren) aktiviert, durch andere (Citrat, Jod, Zinksalze) gehemmt. Es war also zu prüfen, ob auch die Hämolyse durch F I, Lysocithin und gereinigtes Bienengift durch diese Stoffe verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Kaliumcyanid (0,001 m), Calciumchlorid (0,001 bzw. 0,0001 m in Veronalpuffer p_H 7,0), Citrat (0,01 m) Acetat (0,001 m), Glykokoll (0,1%) waren jedoch in den untersuchten Konzentrationen ohne Einfluß auf die Lysocithinwirkung. Auch F I wurde durch Kaliumcyanid (0,001 m) und Calciumchlorid (0,001 bzw. 0,0001 m in Veronalpuffer p_H 7,0) nicht beeinflußt. Jod (1:400000) verstärkte die F I-Hämolyse um ca. 30%, jedoch mag dies mit Wirkungen auf den Erythrocyten (GESSNER u. KÖSTER) zusammenhängen. Zinkchlorid (0,001 m) hemmte F I sehr stark, ebenso die Lysocithinhämolyse; niedrigere Zinkkonzentrationen (0,0001 m) schienen zu aktivieren

(Tabelle 8). Calciumchlorid (0,00025 m) aktivierte die Hämolyse durch phospholipasehaltiges Bienengift in Bestätigung der Versuche von Schwenkert, Gastpar u. Seitz angedeutet, Zusatz von Natriumcitrat (0,027 m) schwächte sie auf $^1/_3$ des Ausgangswertes ab. Dieser Effekt kann nicht auf eine Phospholipasehemmung bezogen werden, da auch F I, welche wir zur sicheren Ausschaltung von Phospholipase A vorher in n/20 Sodalösung erhitzt hatten, durch Citrat stark gehemmt wurde. Möglicherweise beruht dies auf einer Komplexbildung zwischen der basischen F I und dem Citration. Auch eine Änderung des Erythrocytenvolumens unter

Tabelle 8. *Einfluß von Zink- und Calciumionen auf die Hämolyse durch F I und Lysocithin* (Ansätze unter Standardbedingungen)

		D_{50} (γ/cm³) Fraktion I	D_{50} (γ/cm³) Lysocithin
Kontrolle (Veronalpuffer)		2,6	4,9
Zinkchlorid	0,001 m	>50	>50
	0,0001 m	2,35	3,6
Calciumchlorid	0,001 m	2,40	5,2
	0,0001 m	2,60	5,1

Citrateinfluß mit daraus resultierender veränderter Beeinflußbarkeit, wie sie für Lysocithin beschrieben wurde (Wilbur u. Collier), kann diskutiert werden. Vorbebrütung von F I 1:10000 mit 1,9%iger Citratlösung führt, wie anschließende Verdünnung mit Pufferlösung und Bestimmung der Dosiswirkungskurve ergibt, nicht zur Abschwächung der F I-Wirkung. Citrat muß also in einer gewissen Mindestkonzentration im Hämolysenansatz selbst vorliegen (Versuche bei pH 9,2).

Wegen der starken Basicität von F I versuchten wir auch, durch vorherige Applikation von Protaminsulfat die hypothetischen sauren Angriffspunkte am Erythrocyten zu besetzen. Dies gelang jedoch nicht eindeutig. Zwar wurde durch 0,5% Protamin eine geringe Minderung der F I-Hämolyse (Erhöhung der D_{50} von 2,15 auf 2,75 γ/cm³) erzielt, diese kann jedoch nicht der Basicität des Protaminsulfats zugeschrieben werden, da auch Glykokoll in der gleichen Konzentration ähnlich wirkte (D_{50} = 2,50 γ/cm³). Übrigens wird auch durch das Antihistaminicum Antistin (1:1000) die F I-Hämolyse deutlich (um ca. 50%) gehemmt. Über den näheren Wirkungsmechanismus könnten einstweilen nur Vermutungen geäußert werden. Immerhin bestehen hier interessante Parallelen zur Verhütung von Bienengiftschäden am Kaninchenauge durch Antihistaminica (Jaeger). Antistin 1:4000 bis 1:40000 schwächt daneben auch die Lysocithinhämolyse ab.

Einfluß von Reduktionsmitteln. Das von F. G. Fischer u. W. P. Neumann festgestellte Fehlen von Schwefel in der Bienengiftfraktion I macht verständlich, daß die F I-Hämolyse durch Kaliumcyanid nicht beeinflußt wurde. Binet, Weller u. Robillard haben jedoch eine Minderung der Allgemeintoxicität von Bienengift durch Zusatz von

SH-Reagentien beschrieben, und nach LECLERQ, FISCHER u. LECOMTE sollen Bienen- und Wespengiftpräparate SH-Gruppen in SS-Gruppen überführen. Zur Klärung dieser Diskrepanz ließen wir Blausäure, Cystein und Thioglykolsäure unter verschiedenen Bedingungen auf F I einwirken.

Bei der 1. Versuchsreihe gaben wir zu 0,5 cm³ F I 1:1000 in gepufferter Kochsalzlösung (p_H 7,0) je 0,5 cm³ einer neutralisierten Thioglykolsäure (5% = 0,54 m)-, Thioglykolsäure (0,5%)-, Glykolsäure (4,75% = 0,63 m)-, Milchsäure (5% = 0,55 m)- oder Kochsalzlösung, stellten mit sekundärem Natriumphosphat die gesamten Ansätze gegen Spezialindikatorpapier auf p_H 7,5—7,6 ein und hielten sie 2 Std bei 37°. Anschließend wurde mit Puffer p_H 7,0 auf 1:25000 (= 12,5 cm³) aufgefüllt. Weiterverdünnung und Hämolyse erfolgte wie üblich. Bei der Behandlung von F I mit Thioglykolsäure trat eine starke Trübung auf. Vergleichsweise

Tabelle 9. *Einfluß von Thioglykolat und Strukturverwandten auf die F I-Hämolyse* (Ansätze s. Text)

Zugesetzte Substanz (Anfangskonzentration)	D_{50} (γ/cm³)	Verhältniszahl
NaCl 0,85%	2,7	1,00
Thioglykolat 5%	>30	<0,09
Thioglykolat 0,5%	8,9	0,30
Glykolat 4,75%	2,7	1,00
Lactat 5%	2,4	1,12 (nicht signifikant)

wurde auch Lysocithin und Digitonin mit Thioglykolsäure inkubiert. Wegen der schlechten Löslichkeit des Digitonins wurden 1 cm³ Digitonin bzw. Lysocithin 1:2000 mit 11 cm³ 2,5%iger neutralisierter Thioglykolsäurelösung versetzt; sonst wurde wie bei F I verfahren.

Bei der 2. Versuchsreihe wurden 0,5 cm³ F I mit 0,5 cm³ 0,5 m Cystein-, Na_2S- bzw. Pufferlösung analog behandelt.

Schließlich war noch zu prüfen, ob F I auch in stärker verdünnten Ansätzen mit Thioglykolsäure reagiert. Hierzu wurden je 2,5 cm³ F I 1:25000 –1:400000 in Puffer p_H 7,0 mit 2,5 cm³ 0,4%iger neutralisierter Thioglykolsäurelösung in Puffer p_H 7,0 vereinigt, wie üblich 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen und nach Zusatz von 5 cm³ 1,2%iger Erythrocytensuspension 40 min bei 37° gehalten.

Von den untersuchten Substanzen hemmte, wie Tabelle 9 zeigt, lediglich Thioglykolat die F I-Hämolyse, während es die durch Digitonin oder Lysocithin nicht beeinflußte. Die Hemmung war auch noch bei Inkubation mit 0,5%iger Thioglykolatlösung deutlich ausgeprägt. Strukturverwandte Ionen wie Glykolat oder Lactat, waren ohne jeden Effekt. Die Hemmbarkeit von F I durch Thioglykolat läßt sich auch bei p_H 9,2 nachweisen.

Bei Anwendung niedriger Thioglykolat- und F I-Konzentrationen kam keine Hemmung zustande (Ansatz 3), auch nicht bei Vorinkubation mit KCN oder Na_2S unter den angegebenen Bedingungen (Ansatz 2). Cystein hemmte angedeutet (ca. 10%).

Der Reaktionspartner des Thioglykolats ist F I und nicht etwa die Erythrocytenwand. Dafür spricht zunächst die Trübung des inkubierten Gemisches, ferner die fehlende Hemmbarkeit der Digitonin- und Lysocithinwirkung, schließlich die Tatsache, daß es, wie der Vergleich von Versuchsreihe 1 und 3 zeigt, darauf ankommt, in welcher Konzentration F I mit Thioglykolat in Berührung kommt. Da eine Reduktion von SS-Bindungen in dem schwefelfreien F I-Molekül nicht in Frage kommt, muß entweder an eine Komplexbildung zwischen der stark basischen F I und der SH-Gruppe der Thioglykolsäure gedacht werden, ähnlich wie etwa diese Gruppe Schwermetallionen zu binden vermag, oder aber es finden sich andere, noch unbekannte oxydierende Gruppen in F I.

c) Physikalische Einflüsse

Ultraviolettbestrahlung. Sowohl F I als auch die elektrophoretische F II besitzt das für Eiweißkörper typische Ultraviolettspektrum mit dem Maximum bei 279—280 mμ, welches auf das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren hinweist (Neumann u. Habermann (1)). In F I läßt sich nach F. G. Fischer u. H. Dörfel hiervon nur Tryptophan nachweisen, während F II außerdem Tyrosin und Phenylalanin enthält.

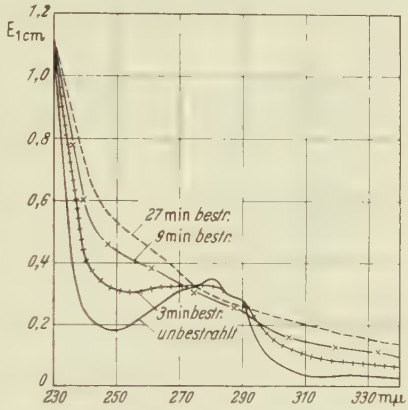


Abb. 7. Änderung des Ultraviolettspektrums von Fraktion I durch Bestrahlung. Ordinate: Extinktion. Abszisse: Wellenlänge (mμ). Hämolysebestimmungen unter Standardbedingungen: D_{50} unbestrahlt 4 γ/cm³, 3 min bestrahlt 7 γ/cm³, 9 min bestrahlt 11 γ/cm³, 27 min bestrahlt 29 γ/cm³

Eine F I-Lösung 1:5000 in Phosphatpuffer p_H 7,0 wurde in flachen Glasschalen (Schichtdicke 1 cm) 3 min bzw. 9 min bzw. 27 min mit einer Analysenquarzlampe „Hanau" ohne Filter, Abstand ca. 30 cm, bestrahlt, anschließend das Spektrum aufgenommen, der Rest verdünnt und zur Hämolyse verwendet. Die bestrahlte Lösung fluoreszierte um so intensiver mit stahlblauer Farbe, je länger sie vorher exponiert worden war. Extinktionsmessung mit dem Beckman-Spektrophotometer DU, Schichtdicke 1 cm.

Die UV-Bestrahlung führte unter den genannten Bedingungen zu starkem Abfall der hämolytischen Wirkung mit gleichzeitiger Veränderung des Spektrums (Abb. 7). Jedoch war auch nach 27 min langer Exponierung noch etwas Aktivität vorhanden.

Thermoresistenz. Es war früher gefunden worden, daß die Phospholipase A von Bienengift unterhalb p_H 7 relativ thermostabil ist, während sie im Alkalischen durch Hitze rasch zerstört wird (Neumann u. Habermann (2), Habermann u. Neumann (1)). Falls F I im Alkalischen thermostabil wäre, müßte sich das direkt hämolysierende Prinzip auf diese Weise von der Lecithase gewissermaßen subtrahieren lassen.

Das Erhitzen bei verschiedenem p_H wurde wie folgt vollführt: 0,5 cm³ F I 1:5000 in physiologischer Kochsalzlösung wurde mit 0,5 cm³ 1:3 mit physiolo-

gischer Kochsalzlösung verdünntem Phosphat-Citrat-Puffer des in Tabelle 10 angegebenen p_H nach McIlvaine, Salzsäure, Natronlauge oder Sodalösung versetzt und 15 min auf 98° erhitzt. Anschließend wurde mit n/10 Salzsäure bzw. Sodalösung neutralisiert und mit Veronalpuffer p_H 9,2 die gewünschte Verdünnung bereitet.

Das direkt-hämolytische Prinzip von Bienengift erwies sich im Sauren als sehr thermostabil, jenseits von p_H 7 wird es zunehmend thermolabil (vgl. Tabelle 10). Beim Erhitzen von gereinigtem Gift im Alkalischen wurde die Dosis-Wirkungskurve flacher, ein Befund, der beim Erhitzen von F I nur angedeutet zu erhalten war. Wir möchten dies als Folge der Inaktivierung der Phospholipase A auffassen.

Tabelle 10. p_H-*Abhängigkeit der Thermoresistenz von F I und Lysocithin* (Vorbehandlung s. Text. Hämolyse unter Standardbedingungen)

Fraktion I (p_H 9,2)		Lysocithin (p_H 7,0)	
Zusatz	D_{50} (γ/cm³)	Zusatz	D_{50} (γ/cm³)
n/20 HCl	0,46	n/10 HCl	6,4
Puffer p_H 2,2	0,40	Puffer p_H 4,0	3,5
p_H 4,0	0,39	p_H 7,0	3,25
p_H 6,0	0,44	n/10 Na_2CO_3	14,5
p_H 8,0	0,49	Nicht erh. Kontr.	2,95
n/20 Na_2CO_3	0,80		
n/20 NaOH	1,75		
Nicht erhitzte Kontrolle	0,37		

Die Thermoresistenz von Lysocithin ist schwer zu überprüfen, da eines seiner evtl. entstehenden Spaltprodukte, nämlich die Fettsäure, ebenfalls hämolysiert.

Das Erhitzen wurde wie bei F I ausgeführt. Zu 1 cm³ Lysocithin 1:500 in Kochsalzlösung wurde 1 cm³ n/10 Salzsäure bzw. Phosphat-Citratpuffer p_H 4,0, Phosphatpuffer p_H 7,0, n/10 Sodalösung oder Phosphatpuffer pH 7,0 gegeben. Das letzte Röhrchen diente als Kontrolle. Die übrigen wurden im Wasserbad 15 min lang auf 98° erhitzt und nach Abkühlung und Neutralisation weiter verdünnt.

Das Maximum der Thermostabilität lag in der Nähe des Neutralpunktes, während im Sauren und noch mehr im Alkalischen das hämolytische Vermögen stark reduziert war. Möglicherweise ist die nach Alkalibehandlung noch vorhandene Restaktivität auf die freigesetzte Fettsäure zurückzuführen (vgl. Tabelle 10).

6. Über die Beziehung zwischen Kalium- und Hämoglobinaustritt unter dem Einfluß tierischer Gifte

Nach Davson u. Danielli kommt es unter dem Einfluß verschiedener Hämolytica zu prolytischem Kaliumverlust, d. h. ehe der Blutfarbstoffaustritt auch nur beginnt, ist bereits ein Teil des Zellkaliums in das um-

gebende Medium diffundiert. Wir möchten den genannten Begriff erweitern und in dieser Arbeit als „prolytisch" jeden Kaliumverlust bezeichnen, der prozentual über das Ausmaß der am Hämoglobinaustritt gemessenen Hämolyse hinausgeht.

Im Rahmen unserer vergleichenden Untersuchungen interessierte vor allem, wie groß der prolytische Kaliumverlust bei der Hämolyse durch Bienen- und Schlangengifte im Vergleich zu der durch Digitonin, Lysocithin und Hypotonie hervorgerufenen ist. Daran schlossen sich Versuche über die Kaliumfreisetzung aus Froschmuskeln an; denn es war zu erwarten, daß die funktionellen Membranveränderungen, welche zum Kaliumaustritt führen, auch an der Muskulatur auslösbar sein würden. Die letztgenannten Versuche gehen jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus und werden deshalb an anderer Stelle näher beschrieben werden.

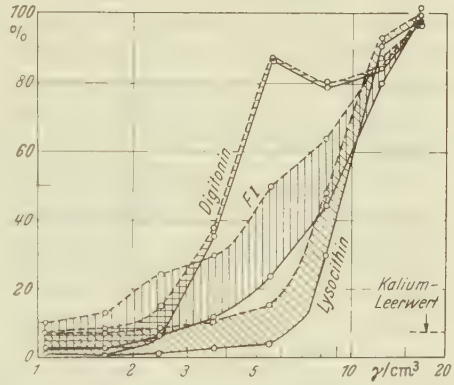


Abb. 8. Hämoglobin- und Kaliumaustritt unter dem Einfluß von Digitonin, Fraktion I und Lysocithin. Ordinate: prozentualer Austritt von Kalium (- - - - -) bzw. Hämoglobin (————); Abszisse: Lysinkonzentration (γ/cm³). Versuchsausführung s. Text

Davson u. Danielli fanden eine Kaliumfreisetzung durch Digitonin erst in lytischen Konzentrationen; allerdings ging sie über das Ausmaß des Hämoglobinaustritts hinaus. Collier (2) beobachtete dagegen bei Anwendung einer eben hämolysierenden Konzentration von Lysocithin keine über die prozentuale Hämolyse hinausgehende Kaliumfreisetzung. Levi fand nach Einwirkung von Bienengift auf Erythrocyten mehr Kalium im umgebenden Medium als bei der Kontrolle, setzte aber den Kaliumverlust nicht mit dem evtl. gleichzeitigen Hämoglobinverlust in Beziehung.

3mal mit Kochsalzlösung gewaschene Erythrocyten wurden in einer mit primärem und sekundärem Natriumphosphat gepufferten 0,85%igen Kochsalzlösung (p_H 7,0) suspendiert (500 cm³ 0,85%ige Kochsalzlösung + 27,5 cm³ 0,5 m Na_2HPO_4 + 1,6 cm³ 4 m NaH_2PO_4). Das Hämolyticum wurde in der gleichen Lösung bereitet. Ansatz: 5 cm³ 3%ige Erythrocytensuspension + 5 cm³ Giftlösung; 4 Std bei 37°. Die Hämoglobinmessung erfolgte wie üblich, die Kaliumbestimmung im Beckman-Flammenphotometer (Acetylen-Sauerstoff-Flamme, 766 mμ). Die Eichlösungen für die Kaliumbestimmung wurden wegen der Verstärkung der Kaliumemission in Gegenwart von Natrium in der nämlichen gepufferten Kochsalzlösung hergestellt. Bei den Versuchen zur Hypotonie-Hämolyse wurde eine 3%ige Erythrocytensuspension in Puffer verschiedener Tonicität 40 min bei 37° bebrütet, nach dem Zentrifugieren ein Anteil des Überstehenden durch Zusatz von gepufferter Kochsalzlösung und Wasser auf ein Konzentrationsverhältnis von 3 Teilen physiologischer Kochsalzlösung zu 2 Teilen Wasser gebracht und erst dann Hämoglobin und Kaliumgehalt bestimmt.

Auch bei giftfreien Kontrollen traten nach mehrstündiger Bebrütung ohne begleitende Hämolyse ca. 5—7% des Zellkaliums aus. F I von Bienengift führte zu starkem prolytischem Kaliumverlust, welcher im Bereich der 25%-Hämolyse prozentual mehr als das Doppelte des freigesetzten Hämoglobins betrug. Der prolytische Kaliumverlust unter Lysocithineinwirkung war gering, aber noch nachweisbar. Nach Inkubation mit Digitonin trat, wie schon Davson u. Danielli beobachteten, nur eine sehr geringe Kaliummenge zusätzlich aus (vgl. Abb. 8). Wesentlich erschien ein Vergleich mit der Hypotoniehämolyse. Der prolytische Kaliumverlust ist bei der Digitoninhämolyse erheblich kleiner, bei der F I-Hämolyse erheblich größer, während er bei der durch Lysocithin etwa in der gleichen Größenordnung liegt.

Schlangengifte, wie die von Naja nigricollis, Naja naja oder Naja haje, verursachten bei 4stündiger Inkubation im Gegensatz zu Bienengift und F I keine stärkere, über das Ausmaß der Hämolyse hinausgehende Kaliumfreisetzung.

7. Stoffwechseländerungen des Erythrocyten unter dem Einfluß hämolysierender Gifte

a) Beziehungen zwischen Cholinesterasehemmung und Permeabilitätssteigerung

In neuerer Zeit wurden von Greig und Mitarbeitern (Lindvig, Greig u. Peterson; Greig, Faulkner u. Mayberry) Beziehungen zwischen Cholinesterasefunktion und Permeabilität angenommen. Da einerseits die Permeabilitätssteigerung, andererseits die Cholinesterasehemmung durch Bienengift (Zeller, Kocher u. Maritz, Augustinsson) bekannt war, lag es nahe, diese beiden Eigenschaften experimentell zu vergleichen. Vorher aber mußte festgestellt werden, welche Fraktion von Bienengift Cholinesterase hemmt. Gleichzeitig untersuchten wir den Einfluß von Protaminsulfat, das in verschiedener Beziehung (Basicität, Molekulargewicht) der F I ähnelt, außerdem den von Digitonin als einem Hämolyticum von anderem Wirkungstypus.

Methodik: Die Aktivität der sog. Plasma-Cholinesterase wurde manometrisch nach Ammon im Warburg-Apparat bestimmt. Ins Hauptgefäß kam 1 cm³ Plasma, welches im Verhältnis 1:14 mit 1%iger $NaHCO_3$-Lösung verdünnt war, sowie 2 cm³ „Zusatz" in physiologischer Kochsalzlösung; in den Seitenarm wurden 0,3 cm³ 2%ige Acetylcholinlösung in Wasser pipettiert. Gasphase: 95% Stickstoff, 5% Kohlendioxyd; Reaktionstemperatur: 38°; Schüttelfrequenz: 130/min.

Versuchsbeispiel:

Zusätze		Acetylcholinspaltung (μM/30 min)
I = giftfreie Kontrolle		8,9
II = chromatographische F I	150 γ/cm³	8,1
III = Protaminsulfat	1500 γ/cm³	7,6
IV = natives Bienengift	150 γ/cm³	5,7
V = gereinigtes Bienengift	150 γ/cm³	4,2
VI = elektrophoretische Fraktion I	150 γ/cm³	4,2

Gereinigtes Bienengift sowie die daraus elektrophoretisch gewonnene F I hemmten die Plasma-Cholinesterase stark, Bienen-Nativgift ebenfalls, aber (vielleicht wegen seines prozentual geringeren Gehaltes an F I) viel schwächer als gereinigtes Gift. Protaminsulfat, Digitonin und merkwürdigerweise auch die chromatographisch gewonnene F I inaktivierten nur angedeutet. Es ist dies der einzige bisher gefundene Unterschied zwischen der Wirkung von papierelektrophoretischer und chromatographischer F I. Lysocithin war, wie ein weiterer Versuch ergab, unter gleichen Bedingungen noch in Konzentrationen von 1,5 mg/cm³ ohne nennenswerten Effekt.

Mit einer 2. Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob der Prozeß der Bienengift- bzw. Digitoninhämolyse die Cholinesteraseaktivität menschlicher Erythrocyten beeinflußt.

In den Hauptraum doppelarmiger Warburg-Gefäße wurde 1 cm³ Erythrocytensuspension 1:50 (hergestellt durch Aufschwemmung von 0,5 cm³ Erythrocytenbrei in 24,5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung), 0,85 cm³ Natriumbicarbonat (1%ig)- und 0,85 cm³ 0,85%iger Kochsalzlösung gegeben. In den einen Seitenarm wurden 0,3 cm³ einer 2%igen Acetylcholinlösung, in den anderen 0,3 cm³ Bienengiftlösung bzw. Digitoninlösung gegeben. Nach Durchströmung mit Stickstoff- (95%) Kohlendioxyd- (5%) Gemisch, thermischer Equilibrierung und Verschluß der Hähne wurde zunächst die Acetylcholinlösung ins Hauptgefäß gekippt und die Reaktion 20 min lang verfolgt; anschließend wurde das Hämolyticum zugegeben und die Gasfreisetzung weitere 30 min lang gemessen.

Versuchsbeispiel: In den ersten 20 min wurden pro Reaktionsgefäß im Mittel 3,05 µM Acetylcholin gespalten; in den darauf folgenden 30 min im

Ansatz mit		µM Acetylcholin
gereinigtem Bienengift	1: 1100	4,8
gereinigtem Bienengift	1:11000	4,9
Lysocithin	1: 1100	4,6
Digitonin	1: 1100	2,7
Digitonin	1:11000	3,8
Quartamon	1:22000	1,4
Kontrolle		4,2

Mit der Bienengift- und der Lysocithinhämolyse ging keine signifikante Cholinesterasehemmung einher. Es besteht also auch kein Parallelismus zwischen der Permeabilitätssteigerung und der Cholinesterasehemmung durch diese Pharmaka. Digitonin hemmte erst in sehr hohen, schon nicht mehr komplett löslichen Konzentrationen. Quartamon als Invertseife inaktivierte erwartungsgemäß sehr stark.

b) Beziehungen zwischen Atmungshemmung und Hämolyse durch tierische Gifte

Die Erythrocytenatmung wird im Verlauf der Hämolyse gehemmt (Ponder). Die starke Inaktivierung oxydierender Fermentsysteme des intermediären Stoffwechsels durch tierische Gifte geht jedoch nicht mit deren hämolytischem Vermögen parallel (Habermann (1)). Wie

unsere Substanzen auf die Atmung intakter Zellen, z. B. Erythrocyten, wirken, war bisher nicht bekannt. Deshalb prüften wir gereinigtes Bienengift, F I, Lysocithin, Nigricollis-, Haje- und Ammodytesgift bezüglich ihres Einflusses auf die durch Zusatz von Glucose und Methylenblau aktivierte Atmung menschlicher Erythrocyten.

Ansatz: 1 cm³ Erythrocytensuspension (3mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit Tyrodelösung auf das ursprüngliche Blutvolumen aufgefüllt) + 1 cm³ 0,015%iges Methylenblau in Tyrodelösung + 1 cm³ 0,3%ige Glucose in Tyrodelösung. Gasphase: Sauerstoff; im Zentralgefäß 0,2 cm³ 20%ige Kalilauge mit Absorptionspapier; Reaktionstemperatur 38°; Schüttelfrequenz 130/min. Nach 30 min Beobachtungszeit wurden 0,3 cm³ Gift, in Tyrode gelöst, zugekippt und die Reaktion weiter verfolgt.

Bienengift hemmt ebenso wie die (direkt hämolysierenden) Gifte von Naja nigricollis und Naja haje sowie Digitonin die Erythrocytenatmung in lytischen Konzentrationen. F I kann in dieser Hinsicht gereinigtes Bienengift ersetzen; die Phospholipase ist also an der Hemmung der Erythrocytenatmung nicht entscheidend beteiligt, obwohl Lysocithin für sich allein hierzu imstande ist. Intakte Erythrocyten werden durch Schlangengift nicht in ihrem Sauerstoffverbrauch beeinflußt, wie am Beispiel des die Mitochondrienatmung stark abschwächenden (HABERMANN (6)) aber unter unseren Bedingungen nicht direkt hämolysierenden Ammodytesgiftes zu erkennen ist.

Versuchsbeispiele:

a) Versuche mit Bienengift und Lysocithin. Mittlerer O_2-Verbrauch in den ersten 30 min 1,30 µM. O_2-Verbrauch in den nächsten 40 min (in µM):

Kontrolle (keine Hämolyse)			1,39
Lysocithin	1: 11000	(Hämolyse)	0,18
Lysocithin	1:110000	(keine Hämolyse)	1,48
gereinigtes Bienengift	1: 11000	(Hämolyse)	0,22
gereinigtes Bienengift	1:110000	(partielle Hämolyse)	1,26
Fraktion I	1: 11000	(Hämolyse)	0,13
Fraktion I	1:110000	(partielle Hämolyse)	1,07

b) Versuche mit Nigricollisgift und Digitonin. Mittlerer O_2-Verbrauch in den ersten 30 min 1,46 µM. O_2-Verbrauch in den nächsten 40 min (in µM):

Kontrolle		(keine Hämolyse)	1,72
Digitonin	1: 1100	(Hämolyse)	0,61
Digitonin	1: 11000	(Hämolyse)	1,23
Nigricollisgift	1: 1100	(Hämolyse)	0,07
Nigricollisgift	1: 11000	(Hämolyse)	0,40
Nigricollisgift	1:110000	(partielle Hämolyse)	1,64

c) Versuche mit Ammodytes- und Haje-Gift. Mittlerer O_2-Verbrauch in den ersten 30 min 1,39 µM. O_2-Verbrauch in den nächsten 40 min (in µM):

Kontrolle		(keine Hämolyse)	1,79
Ammodytesgift	1: 1100	(keine Hämolyse)	1,74
Haje-Gift	1: 1100	(Hämolyse)	0,63
Haje-Gift	1: 11000	(partielle Hämolyse)	0,98

Tierische Gifte hemmen also die Erythrocytenatmung nur insoweit als sie Hämolyse bedingen. Da auch alle anderen untersuchten Hämo-

lytica in lytischen Konzentrationen die Atmung aufheben, ist dieser Effekt tierischer Gifte wohl nicht als spezifisch zu betrachten.

Besprechung der Ergebnisse

Die von uns erstmals isolierte Fraktion I von Bienengift (F I) stellt ein Hämolyticum neuen Typs dar. Nur im Hinblick auf bestimmte Teileigenschaften läßt es sich mit bereits bekannten Substanzen vergleichen.

Bereits seine *Dosis-Wirkungskurve* ist erheblich flacher als beispielsweise die von Lysocithin, Digitonin, quarternären Ammoniumbasen oder Schlangengiften. Die bisher vorliegenden Präparate von F I sind sicher noch nicht einheitlich. Da nun aber nach allgemeiner Anschauung die Steilheit der Dosis-Wirkungskurve ein Ausdruck der Resistenzverteilung der Erythrocyten sein soll, kann die geringe Neigung der F I-Kurve als Folge des kombinierten Effekts mehrerer verwandter Lysine gedeutet werden. Nun scheint allerdings die eben zitierte Annahme durchaus nicht für jeden Fall gültig zu sein. Es wäre z. B. sonst unverständlich, weshalb bei der Digitoninhämolyse eine Zonenbildung (Jung u. Schwartzkopff, eigene Versuche) auftritt, d. h. daß gelegentlich niedrigere Lysinkonzentrationen mehr Hämoglobin freisetzen als höhere. Vollends unhaltbar wird diese These im Fall der Hämolyse durch Bienengesamtgift. Hier überlagern sich nämlich, wie wir im Laufe dieser Untersuchungen eingehend bewiesen, 2 Konzentrationsgradienten, nämlich der von F I und der des Lysocithins, welches aus der Erythrocytenwand der von F I „angeschlagenen" Zellen unter dem Einfluß der Phospholipase A des Giftes entsteht. Die Resultante der beiden Konzentrationsgradienten ist eine außerordentlich steile Kurve. Es wäre falsch, aus ihrer Steilheit eine primäre, schmale Resistenzverteilung über unser Erythrocytenkollektiv herauslesen zu wollen. Man sollte vielmehr auch bei anderen Hämolytica daran denken, daß sich einer einfachen Primärreaktion komplizierte Sekundärreaktionen überlagern können, beispielsweise durch Bildung von Komplexen zwischen Hämolysin und Zellwandbestandteilen, welche die weitere Hämolyse fördern oder hemmen. Dadurch kompliziert sich das Gesamtbild der Lyse erheblich. Ein Rückschluß auf die Primärreaktion oder gar eine mathematische Erfassung derselben, wie sie z. B. von Ponder versucht wird, wird nahezu unmöglich. Die entscheidende Vorbedingung zum Studium solcher Abläufe besteht darin, daß man einzelne Wirkfaktoren in die Hand zu bekommen sucht, wie wir dies im Falle der Bienengifthämolyse erstrebten.

Auch bezüglich des Verhaltens gegenüber *osmotischen Einflüssen* kommt der Fraktion I-Hämolyse eine gewisse Sonderstellung zu. Gerade bei den Versuchen zu diesem Thema erwies es sich, daß der osmotische Druck 2 ganz verschiedene Mechanismen beeinflussen kann: Einerseits die zur Lyse führende Reaktion selbst, andererseits den Farbstoffaustritt

aus dem mit dem Pharmacon vorbehandelten Erythrocyten. Eine Substanz, welche bei niedrigerem osmotischem Druck stärker hämolysiert als bei höherem, muß, wie das Beispiel von F I zeigt, nicht notwendig die osmotische Resistenz der Erythrocyten vermindern. Umgekehrt wird diese durch Lysocithin erniedrigt, während dessen eigentliche Hämolysewirkung durch Variation des osmotischen Drucks nach unseren Versuchen nur sehr wenig, nach COLLIER (2) gar nicht beeinflußt wird. Einen dritten Typ verkörpert Digitonin, welches das osmotische Verhalten unserer Erythrocytensuspension nicht wesentlich änderte und dessen hämolytische Fähigkeit auch durch Variation des osmotischen Drucks nicht

Tabelle 11. *Vergleich einiger Eigenschaften von Digitonin, Lysocithin und Bienengift-Fraktion I*

	Digitonin	Lysocithin	Fraktion I
Hämolyse-Typ[1]	nicht osmotisch	osmotisch	nicht osmotisch
Abhängigkeit vom osmotischen Milieu	keine	sehr gering	deutlich
Prolytischer Kaliumverlust	angedeutet	gering	stark

[1] In Anlehnung an die Methodik von WILBRANDT bestimmt.

verändert wurde. Aus all dem muß der Schluß gezogen werden, daß die Einteilung der Hämolysen in osmotisch bedingte und nicht osmotisch bedingte (WILBRANDT), rein nach dem Verhalten der unhämolysierten Zellen gegenüber dem osmotischen Druck, den Einfluß dieses Faktors nicht ausreichend berücksichtigt. Während mit dem Verfahren der kombinierten Gift-Hypotonie-Hämolyse und mit dem der aufeinanderfolgenden Gift-Hypotonie-Hämolyse offenbar sehr verschiedene Dinge gemessen werden, besteht bei unseren Hämolyticis ein Parallelismus zwischen prolytischer Kaliumfreisetzung und der Abhängigkeit der Gifthämolyse vom momentanen osmotischen Druck (vgl. Tabelle 11).

Das Verhalten gegenüber *Aktivatoren und Inhibitoren* erlaubt Schlüsse auf chemische Konstitution und Wirkungsweise des betreffenden Hämolyticums. Teilweise gehen die von uns untersuchten Inhibitoren eine komplex- oder salzartige Bindung mit Fraktion I ein, insbesondere Polysaccharidschwefelsäureester, wie Heparin oder Thrombocid. Durch Reaktion zwischen den sauren Gruppen in den hochmolekularen Estern und den basischen von Fraktion I kommen offenbar Aggregate zustande, welche erheblich geringere Löslichkeit und biologische Wirkung besitzen. Wie wir in Zusammenarbeit mit SCHLÖGL nachwiesen, werden neben der Bienengifthämolyse noch andere pharmakologische Effekte, wie die Kontraktion des Skeletmuskels, die Schädigung des isolierten Froschherzens, die Lokaltoxicität am Kaninchenauge, auf diese Weise abgeschwächt. Auch Lecithin, dessen isoelektrischer Punkt ebenfalls im Sauren liegt

(Fujii, Price u. Lewis), dürfte zu derartiger Aggregatbildung befähigt sein. Weniger klar erscheint der Wirkungsmechanismus einiger anderer Inhibitoren, insbesondere der von bestimmten niedermolekularen Anionen, wie Citrat und Thioglykolat. Verschiedene zum Vergleich untersuchte Ionen, wie Acetat, Lactat oder Glykolat waren ohne jeden Einfluß. Die Citrathemmung könnte man auf eine Komplexbildung mit F I beziehen, die Inaktivierung durch Thioglykolat läßt 2 Deutungen zu: Es könnte, wie wir bereits näher ausgeführt haben, zunächst an eine Komplexbildung, an der die SH-Gruppe der Säure beteiligt sein dürfte, gedacht werden. Andererseits ist bis jetzt noch nicht experimentell ausgeschlossen, daß etwa in F I reduzierbare Gruppen, welche aber nichts mit schwefelhaltigen Konfigurationen zu tun haben können, vorhanden sind.

Die eigentliche *Reaktion zwischen Fraktion I und der Zelle* läßt sich mittels der hier niedergelegten Erkenntnisse wenigstens teilweise verstehen. Der isoelektrische Punkt des Erythrocyten liegt im Sauren. Es ist also durchaus eine Bindung zwischen F I und Erythrocytenwand möglich. Die Bindung an intakte Erythrocyten ist aber offenbar wenig ausgeprägt, denn Erhöhung der Erythrocytenkonzentration mindert zwar die hämolytische Fähigkeit von Lysocithin oder Digitonin, steigert aber in den von uns untersuchten Bereichen die von F I freigesetzte Hämoglobinmenge sehr stark. Es liegt hierbei nicht etwa eine echte Wirkungsverstärkung vor: vielmehr sind in Ansätzen mit erhöhter Erythrocytenzahl auch die besonders F I-empfindlichen Erythrocyten in entsprechend größerer Menge vorhanden. Ein nach Ponder aus den unhämolysierten Erythrocyten austretender Inhibitor muß nach unseren Versuchen für F I und auch für Lysocithin abgelehnt werden. Ist die Hämolyse erst einmal in Gang gekommen, so geht die F I-Wirkung rapide verloren; und zwar wohl durch die Erythrocytenschatten. Dieser Vorgang stellt gewissermaßen die hämatologische Parallele zum „Aufbrauch" von Bienengift an Skelet- und Herzmuskulatur dar, den Andrysek und Späth im hiesigen Institut erstmals untersuchten. Nach gemeinsam mit Schlögl durchgeführten Experimenten wird beim Stehenlassen von Giftlösungen mit zerschnittener Muskulatur nicht nur die Wirkung am quergestreiften Muskel stark gemindert, sondern auch die Lokaltoxicität am Kaninchenauge. Welche Bestandteile des Gewebes das Gift binden, muß noch offen bleiben. Wir denken insbesondere an solche, deren isoelektrischer Punkt im Sauren liegt, wie Lecithin und Kephalin und an Hyaluronsäure, die nach Schlögl die direkte Hämolyse, die Muskelkontraktion und die Reizeffekte am Kaninchenauge abschwächt.

Durch Einwirkung von Fraktion I wird die *Struktur der Erythrocytenwand* grundsätzlich verändert (Habermann u. Mölbert). Hohe Konzentrationen erzeugen das von uns beschriebene Bild einer Schrumpfung und Netzbildung; die Dichte der Erythrocytenschatten nimmt zu. Aller-

dings lassen sich auch aus diesen Bildern keine Rückschlüsse auf diejenigen Veränderungen ziehen, welche zur Hämolyse selbst führen; denn wir sehen ja unter dem Elektronenmikroskop immer nur das Endstadium des bereits total oder weitgehend hämolysierten Erythrocyten. Immerhin sind aber Lysocithin- und Digitoninwirkung auf die Gestalt des Erythrocyten sowohl untereinander als auch im Vergleich zu F I grundverschieden. Es lassen sich auch gewisse Beziehungen zwischen dem morphologischen Effekt der 3 Lysine und ihrem Verhalten gegenüber bestimmten biologischen Substanzen herstellen.

Wie wir anderweitig zeigen, trägt Lysocithin seinen Namen zu vollem Recht, denn es vermag eine ganze Reihe von lipoiden Substanzen in Lösung zu bringen. Als eine Art *biologischer Lösungsvermittler* löst es wohl auch den „Kitt" der Erythrocytenmembran auf. Wegen der mangelhaften Spezifität der Lysocithinwirkung läßt sich aber nicht sagen, woraus eigentlich der „Kitt" des Erythrocyten besteht. Das gleiche Problem tritt auch bei der Untersuchung der Mitochondrienstruktur auf.

F I dagegen stellt — nicht nur im morphologischen Bild der Erythrocytenmembran — ein *Fällungsreagens* dar. Es trübt Eigelb- und Mitochondriensuspensionen, fällt Fibrinogen und hochmolekulare organische Säuren. Digitonin schließlich, welches wohl *elektiv* mit der *Cholesterinkomponente* der Erythrocytenwand reagiert (Schmidt-Thomé), führt zu schollenartigen Veränderungen derselben, welche möglicherweise (ein exakter Beweis steht noch aus) aus Cholesterin-Digitonid bestehen.

So erkennt man, daß sich 3 ganz verschiedene Verfahren, die Prüfung der Kinetik, die Untersuchung der Inhibitoren und die morphologische Betrachtung der Erythrocytenwand in ihren Ergebnissen zu einem zwar noch nicht vollständigen, aber in seinen Grundzügen durchaus einleuchtenden Bild des Wirkungsmechanismus der von uns untersuchten Hämolytica vereinen lassen. Natürlich können wir diese Befunde nicht ohne weiteres auf die Effekte der gleichen Substanzen an anderen Organen übertragen; im Gegenteil, es bestehen an der Muskelmembran zum Teil ganz andere Aktivitätsrelationen als am Erythrocyten (Habermann (6), Heydenreich). Aber diese Unterschiede sind bereits wieder für die Differenzierung verschiedener „Membranarten" von Interesse und werden an anderer Stelle abgehandelt werden.

Zusammenfassung

Die sog. Fraktion I von Bienengift (Melittin) stellt das erste pharmakologisch einheitliche, gewaschene Erythrocyten direkt hämolysierende Agens aus Insektengiften dar.

Seine Dosis-Wirkungskurve ist flacher als die von Lysocithin, Digitonin oder Bienen-Gesamtgift; durch Zusatz der phospholipasehaltigen Frak-

tion II geht sie in die steile Dosis-Wirkungskurve von Bienen-Gesamtgift über.

Die Freisetzung des Blutfarbstoffes durch F I erfolgt im wesentlichen in den ersten Minuten. Ausmaß und Geschwindigkeit steigen mit zunehmender Temperatur. Auch Erhöhung des pH-Wertes bis 9,0—9,5 intensiviert die F I-Hämolyse. Verstärkung des osmotischen Druckes vermindert die Hämoglobinfreisetzung durch F I stärker als die durch Lysocithin. Nach dem osmotischen Verhalten der unhämolysierten Erythrocyten ist die F I-Hämolyse vorwiegend dem nicht osmotisch bedingten, die Lysocithinhämolyse dem osmotisch bedingten Typ (Wilbrandt) zuzuordnen.

Die Menge des durch F I freigestellten Hämoglobins steigt mit zunehmender Erythrocytenmenge im Ansatz, während Digitonin oder Lysocithin unter diesen Bedingungen partiell inaktiviert werden. Während der Lyse wird F I verbraucht, möglicherweise infolge Adsorption an die Erythrocytenstromata.

Plasma, Lecithin, Polysaccharidschwefelsäureester und in geringerem Maße auch bestimmte Albuminpräparate schwächen die F I-Wirkung ab, nicht dagegen Cholesterin in lysocithin- und digitoninhemmenden Dosen. Durch Lecithinzusatz wird auch Lysocithin inaktiviert. F I wird durch Vorbehandlung mit Thioglykolat stark gehemmt, ebenso durch höhere Citratkonzentrationen.

Gegen Erhitzen ist diese Fraktion des Bienengiftes, besonders im sauren Milieu, relativ stabil. UV-Bestrahlung zerstört sie unter gleichzeitiger Veränderung des Spektrums. Die Aktivität von Lysocithin sinkt durch Erhitzen im Sauren oder Alkalischen.

Dem Austritt des Blutfarbstoffs geht ein prolytischer Kaliumverlust voraus, welcher bei Fraktion I stärker ist als beim Lysocithin, bei den untersuchten Schlangengiften aber nicht eindeutig nachweisbar ist.

Bienengift und die daraus isolierte Fraktion I hemmen Plasmacholinesterase. Die Erythrocytencholinesterase wird im Verlauf der Bienengift- und Lysocithinhämolyse nicht beeinflußt. Dagegen läßt sich die durch Methylenblau verstärkte Oxydation von Glucose durch Bienengift, Fraktion I, Lysocithin und hämolysierende Schlangengifte inhibieren.

Die bisher ermittelten Unterschiede im Mechanismus der Hämolyse durch tierische Gifte, Lysocithin und Digitonin werden diskutiert. Lysocithin dürfte die Erythrocytenwand durch „Lyse" zerstören, Fraktion I von Bienengift dagegen durch „Fällung".

Literatur

Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1934). Andrysek, K.: Diss. Würzburg 1952. — Augustinsson, K. B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **15**, Suppl. 52 (1948). — Binet, L., G. Weller et E. Robillard: C. r. Soc. Biol. **131**, 1120 (1939).

Collier, H.: (1) Federat. Proc. **6**, 245 (1947). - (2) J. Gen. Physiol. **35**, 617 (1952). — Davson, H., and J. Danielli: Biochemic. J. **32**, 991 (1938). Delezenne, C., et E. Fourneau: Bull. Soc. Chim. France **1914**, 421; zit. n. Chem. Zbl. **1914**, II, 52. — Derevici, A., M. Derevici et H. Gingold: C. r. Soc. Biol. **130**, 1152 (1939). Fischer, F. G., u. H. Dörfel: Biochem. Z. **324**, 465 (1953). Fischer, F. G., u. W. P. Neumann: Biochem. Z. **324**, 447 (1953). — Fujii, N.: J. Biochem. **3**, 393 (1924). — Gastpar, H., u. W. Seitz: Klin. Wschr. **1954**, 474. - Gessner, O., u. H. Köster: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 177 (1936). Gorter, E., u. J. Hermans: Rec. Trav. Chim. Pays-Bas (Amsterd.) **62**, 681 (1943). Greig, M., J. Faulkner u. T. Mayberry: Arch. of Biochem. a. Biophysics **43**, 38 (1953). Grosse, A., u. K. Tauböck: Z. Rheumaforsch. **5**, 429 (1942). Habermann, E.: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 108 (1953); **222**, 173 (1954). (2) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 182 (1954). (3) Naturwissenschaften **41**, 429 (1954). — (4) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 158 (1955). (5) Z. physiol. Chem. **297**, 104 (1954). — (6) Unveröffentlicht. Habermann, E., u. E. Mölbert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 203 (1954). Habermann, E., u. W. Neumann: (1) Z. physiol. Chem. **297**, 179 (1954). (2) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 388 (1954). Heydenreich, H.: Diss. Würzburg 1957. Jaeger, W.: Graefes Arch. u. Arch. Augenheilk. **154**, 431 (1953). — Jung, F., u. K. Böhm: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 144 (1949). Jung, F., u. I. Schwartzkopff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 556 (1952). Lacaillade, C. W.: Amer. J. Physiol. **105**, 251 (1933); zit. n. Ber. ges. Physiol. **78**, 526 (1934). Langer, J.: Arch. internat. Pharmacodynam. **6**, 181 (1906). Lauter, W. M., and O. J. Griggs: J. Amer. Pharmaceut. Assoc., Sci. Ed. **28**, 519 (1939). — Leclerq, M., P. Fischer et J. Lecomte: Arch. internat. Physiol. **57**, 241 (1949). Levi, H.: Ark. Kemi (Stockh.) **21 A**, 1 (1945). Lindvig, P., M. Greig and S. Peterson: Arch. of Biochem. a. Biophysics. **30**, 241 (1950). Magistris, H.: Biochem. Z. **210**, 85 (1929). Nagamitu, G.: Mitt. med. Ges. Okayama **47**, 3005 (1935); zit. n. Ber. ges. Physiol. **95**, 128 (1936). - Neumann, W., u. E. Habermann: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 367 (1954). — (2) Z. physiol. Chem. **296**, 166 (1954). Neumann, W., E. Habermann u. G. Amend: Naturwissenschaften **39**, 286 (1953). Neumann, W., E. Habermann u. H. Hansen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 130 (1953). Pangborn, M.: J. of Biol. Chem. **188**, 471 (1951). Ponder, E.: Hemolysis and related phenomena. New York 1948. — Price, H., and W. Lewis: Biochem. J. **23**, 1030 (1929). — Reinert, M.: Festschr. E. Barell. S. 407, Basel 1936. Schlögl, W.: Inaug.-Diss. Würzburg 1953. Schmidt-Thomé, J.: Z. physiol. Chem. **275**, 183 (1942). Schwenkert, E., H. Gastpar u. W. Seitz: Klin. Wschr. **1952**, 282. Späth, W.: Inaug.-Diss. Würzburg 1952. Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **245**, 22 (1942). Wilbur, K., and H. Collier: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **22**, 233 (1943). Zeller, E. A., V. Kocher u. A. Maritz: Helvet. physiol. Acta **2**, C 63 (1944).

Dozent Dr. Ernst Habermann, Würzburg, Koellikerstraße 2,
Pharmakologisches Institut der Universität

Druck von J. P. Peter, Gebr. Holstein, Rothenburg o. Tbr.

Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin, Bd. 130, S. 19—23 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Neumann)

Zur Wirkung tierischer Gifte und von Lysocithin auf Grenzflächen

Von

Ernst Habermann

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Dezember 1957)

Wie wir an Erythrocyten nachwiesen (Habermann 5; Habermann u. Mölbert), können tierische Gifte in doppelter Weise die Morphologie geformter Elemente verändern: durch Verdichtung (z. B. Bienengift durch seine Fraktion I; Nigricollisgift) oder durch Auflösung (Phospholipase A; Lysocithin). Ähnlich lassen sich an stark verdünnten Eigelbsuspensionen „trübende" und „klärende" Giftkomponenten unterscheiden (Habermann u. Neumann). Wir suchten in Fortführung dieser Untersuchungen zu ermitteln, ob tierische Gifte bzw. bestimmte Reaktionsprodukte derselben unmittelbar physiko-chemisch faßbare Grenzflächenwirkungen besitzen, die sich auch an Zellpartikeln nachweisen lassen, und ob sich speziell ihre löslichkeitsvermittelnden Fähigkeiten an einfachen Modellen reproduzieren lassen. Über die wichtigsten Ergebnisse haben wir schon kurz berichtet (Habermann 1, 2). Inzwischen hat auch Webster der bereits von Grosse u. Tauböck beobachteten klärenden Wirkung von Lysocithin auf Hirnsuspension Aufmerksamkeit geschenkt, was uns (Neumann u. Habermann 1) zu einigen Hinweisen veranlaßte.

A. Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser durch Bienengift, dessen Fraktion I und Lysocithin

Aus einer 5 cm^3-Rekordspritze wurden durch einen Infusionsapparat in $6\frac{1}{2}$ min 4 cm^3 ausgetrieben, die von dem plangeschliffenen Ende eines senkrechten, dickwandigen Capillarrohres abtropften, so daß die in der Zeiteinheit abtropfende Flüssigkeitsmenge streng konstant blieb. Die Substanzen wurden, wenn nicht besonders angegeben, in verdünntem Phosphatpuffer p_H 7,0 gelöst (0,013 m Phosphat, 0,116 m NaCl).

Bienengift erniedrigte die Oberflächenspannung isotonischer gepufferter Lösung ebenso wie Lysocithin und F I sehr stark (Tabelle 1). Naja-Naja- und Nigricollisgift führten in den höchsten untersuchten Konzentrationen (1:500) nur zu angedeuteter Erniedrigung der Grenzflächenspannung, während das Gift von Vipera ammodytes und Bothrops

alternata ebenso wie das zum Vergleich mit F I herangezogene Protaminsulfat bei Verdünnungen 1:5000 keinerlei Einfluß zeigten.

Die Oberflächenaktivität von Bienengift erwies sich als p_H-abhängig. Ihr Optimum lag wie das der „direkten" Hämolyse (HABERMANN 5) jenseits von p_H 8; in m/20 Sodalösung dagegen war die Wirksamkeit bereits wieder abgefallen. Lecithin und Thrombocid hemmten deutlich, ebenfalls

Tabelle 1. *Änderung der Grenzflächenspannung von Wasser durch verschiedene Hämolytica (Tropfenzahl von je 4 cm³ Lösung; siehe Text)*

Giftkonzentration	Ger. Bienengift	Fraktion I (= Melittin)	Lysocithin	Digitonin
1: 1250	64	—	68,5	ungenügend gelöst
1: 2500	62	—	64	„
1: 5000	59,5	59,5	60,5	„
1:10000	53	54	51	46
1:20000	43	47,5	41	42
1:40000	40	43	39,5	—
1:80000	—	39	—	—

wie im Hämolyseversuch. So setzte Lecithinzusatz 1:2000 unter sonst gleichen Bedingungen die Tropfenzahl einer F I-Lösung 1:10000 von 54 auf 46,5, Thrombocid 1:4000 auf 38 Tropfen herab. Bei Kontrollversuchen ohne Gift veränderten diese beiden Substanzen die normale Tropfenzahl (39) nicht.

B. Einfluß von verschiedenen Hämolyticis auf die optischen Eigenschaften von Partikelsuspensionen

Ein nach CRANE u. LIPMANN hergestelltes Partikelpräparat aus Ratterleber wurde mit Phosphatpuffer auf das 20fache des Ausgangsvolumens verdünnt. Hiervon wurden je 3 cm³ mit 3 cm³ Hämolysinlösung in Puffer versetzt und 40 min bei 37° C gehalten. Anschließend wurde auf 18° C abgekühlt und die Extinktion bei 400 mμ im Beckman-Spektrophotometer (Schichtdicke 1 cm) bestimmt (vgl. Abb. 1).

Unter dem Einfluß von Lysocithin tritt eine Aufhellung der Partikelsuspension ein, Fraktion I dagegen erzeugt eine starke Trübung, welche sich auch in der hohen Extinktion des mit der stärksten F I-Konzentration behandelten Ansatzes ausdrückt. Bei Zusatz von Bienengift kommt beides zustande: in hoher Konzentration die F I-bedingte Trübung, während bei hohen Verdünnungen (noch unter 1:200000000!) eine deutliche Aufhellung der Ansätze nachweisbar ist. Die Trübung durch F I ist bereits binnen weniger Minuten nahezu vollständig und nimmt mit der Zeit nicht nennenswert zu, ebenso auch die Aufhellung durch Lysocithin. Die Klärung der Partikelsuspension durch Bienengift dagegen ist sehr stark zeitabhängig, was für eine enzymatische Reaktion, wohl durch Phospholipase A, spricht. Digitonin erzeugt vergleichsweise sehr viel geringere Veränderungen im Sinne einer ganz geringen Zunahme der Lichtschwächung.

Die starke Mitochondrienausflockung gelang nur mit einem hochgereinigten F I-Präparat, was angesichts der enormen Empfindlichkeit der Partikelpräparate gegenüber Phospholipase A nicht verwunderlich ist. Eigelbsuspension verhält sich gegen Bienengift, Fraktion I und Lysocithin genauso wie das hier untersuchte Partikelpräparat (Habermann u. Neumann).

Elektronenoptische Veränderungen von Mitochondrienpräparaten durch Lysocithin und Phospholipase enthaltende Giftfraktionen sind bekannt (Nygaard, Dianzani u. Bahr); auch über die Änderung der Extinktion von Mitochondriensuspension durch Lysolecithin wurde (nach Veröffentlichung unserer vorläufigen Mitteilung (Habermann 2) berichtet (Witter u. Cottone)).

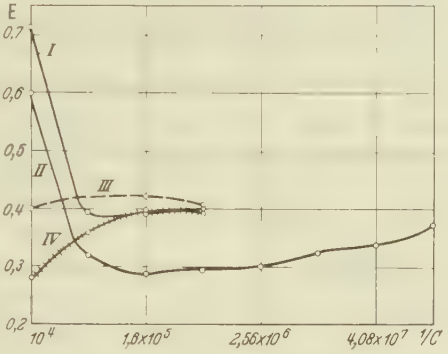


Abb. 1. Änderung der Extinktion einer Zellpartikelsuspension durch verschiedene Hämolytica. Ordinate: Extinktion. Abszisse: Kehrwert der Endkonzentration des Hämolysins. *I* Fraktion I; *II* gereinigtes Bienengift; *III* Digitonin; *IV* Lysocithin

C. Lysocithin als Lösungsvermittler

Früher waren von uns folgende Lösungsvermittlereffekte von Lysocithin beobachtet worden: es löste das Erythrocytenstroma auf, sensibilisierte die Kerne von Froscherythrocyten gegen mechanische Einflüsse (Habermann u. Mölbert), begünstigte die Spaltbarkeit von emulgiertem Lecithin durch Phospholipase A (Habermann 3). Ferner ließ sich eine Klärung von Eigelbemulsion und eine Stabilisierung derselben gegen Hitze erzielen; auf dem Wege über die Lysocithinbildung hemmen phospholipasehaltige Gifte die Hitzecoagulation von Eigelb (Habermann u. Neumann). — Hughes stellte fest, daß das Oberflächenpotential von Lysocithinfilmen geringer war als das von Lecithinfilmen. Er benutzte die Änderung dieser Größe als Maß der Phospholipaseaktivität von Schlangengiften.

Lysocithin wurde in 1:4 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Phosphatpuffer p_H 7,0 gelöst, die zu untersuchenden Substanzen im gleichen Medium teils (z. B. Lecithin) durch Schütteln, teils (z. B. Cholesterin) durch Verdünnung einer konzentrierten methanolischen Lösung mit Puffer emulgiert bzw. suspendiert. Die Emulsionen mit Lysocithin wurden 2 Std im Wasserbad bei 37° C inkubiert, dann wurde durch Einbringung in Leitungswasser die Reaktion verlangsamt und die Lichtschwächung im Beckman-Photometer bei 400 mμ (1 cm Schichtdicke) gemessen. Eichkurven, welche mit Verdünnungen von Lecithin- und Ölsäureemulsionen nach 2stündigem Aufenthalt im Wasserbad hergestellt worden waren, verliefen erstaunlicherweise in dem von uns benutzten Konzentrationsbereich im Sinne des Lambert-Beerschen Gesetzes.

Lysocithin klärt Lecithin-, Cholesterin- und Ölsäureemulsionen. Die Empfindlichkeit dieser Reaktion ist sehr groß; z. B. ist eine Ölsäure-

emulsion 1:4000 in Gegenwart von Lysocithin 1:10000 bereits deutlich aufgehellt, eine Lecithinemulsion 1:4000 noch in Gegenwart von Lysocithin 1:50000. Auch Cholesterinemulsionen scheinen gegenüber Lysocithin hochempfindlich zu sein; jedoch stört die bei dieser Substanz ungleiche, hohe Partikelgröße bei der photometrischen Auswertung. Abb. 2 zeigt, daß die Lösungsvermittlereigenschaft von Lysocithin in fast allen Kurvenbereichen stärker ist als die der durch das Choleinsäureprinzip bekannt gewordenen Desoxycholsäure. Lysocithin reagiert aber nicht nur mit vorwiegend lipoiden Kolloiden; auch Eiweiße werden in Lösung gehalten. Bringt man z. B. eine γ-Globulinlösung 1:4000 mit fallenden Lysocithinkonzentrationen 20 min bei 37°C zusammen, erhitzt hierauf 8 min auf 80°C, kühlt dann ab und mißt die Trübung im Beckman-Photometer, so läßt sich eine deutliche Verminderung der Hitzecoagulationsneigungen in Gegenwart von Lysocithinkonzentrationen über 1:2000 nachweisen.

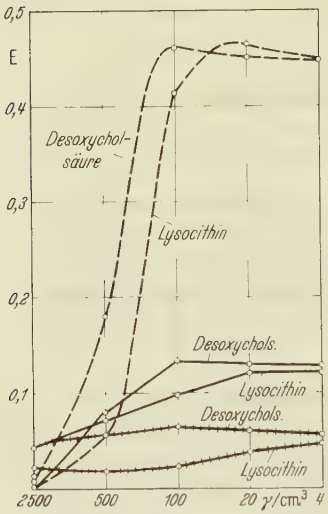


Abb. 2. Vergleich der Lösungsvermittlereigenschaften von Lysocithin und Desoxycholsäure gegenüber Lecithin, Cholesterin und Ölsäure. Ordinate: Extinktion. Abszisse: Endkonzentration des Lösungsvermittlers. ------ Ölsäure 1:4000; ——— Lecithin 1:4000; + + + Cholesterin 1:40000

Diese Effekte sind in mehrfacher Weise interessant. Man könnte z. B. die Lysocithinhämolyse auf Erhöhung der Löslichkeit von Erythrocytenbestandteilen durch diese Substanz zurückführen (vgl. HABERMANN 5). Vor allem aber erscheint es möglich, daß der Körper sich dieses Effektes bedient, um an und für sich schwer lösliche Stoffe in Lösung zu bringen und resorbierbar bzw. angreifbar zu machen sowie Grenzflächen aufzulockern (HABERMANN 2). Es besteht ja praktisch überall, wo Lecithin und Phospholipase nebeneinander vorliegen, die Möglichkeit einer Lysocithinbildung. Neben Zell- und Kernmembranen könnte dabei gleichzeitig noch als weitere Funktionseinheit der Zelle das Mitochondrium in seiner Funktionsfähigkeit beeinflußt werden, denn Lysocithin entkoppelt ja, wie wir nachwiesen (HABERMANN 4), Atmung und Phosphorylierung. Auch von anderer Seite wurde die Rolle von Lysocithin bei der Störung von Mitochondrienfunktionen diskutiert (WITTER u. COTTONE; WITTER, MORRISON u. SHEPARDSON). Allerdings sind zur Untermauerung dieser Hypothesen präzise Kenntnisse über die Verbreitung von Phospholipase A und B in den Organen erforderlich; bisher erschien nur das Vorkommen von Phospholipase A und B im Pankreas gesichert und das von Lyso-

cithin im gleichen Organ wahrscheinlich. In letzter Zeit wurde aber auch über das Vorkommen von Lysolecithin in Nebennierenextrakten (Hajdu und Mitarbeiter) und Dünndarminhalt (Borgström) berichtet. Eine kritische Würdigung der in diesem Zusammenhang wesentlichen Ergebnisse und Auffassungen wird an anderer Stelle (Neumann u. Habermann 2) gegeben.

Zusammenfassung

1. Gereinigtes Bienengift, die daraus gewonnene Fraktion I sowie Lysocithin erniedrigen im Gegensatz zu einigen Schlangengiften die Oberflächenspannung von Wasser stark.

2. Fraktion I trübt Partikelpräparate aus Rattenleber, Lysocithin hellt sie auf.

3. Lysocithin hellt Suspensionen von Lecithin, Cholesterin und Ölsäure auf. Diese Substanz könnte auf Grund ihrer physicochemischen Eigenschaften als biologischer Lösungsvermittler fungieren.

Literatur

Borgström, B.: Acta chem. scand. **11**, 749 (1957). – Crane, R., and F. Lipmann: J. biol. Chem. **201**, 235 (1953). – Grosse, A., u. K. Taubböck: Z. Rheumaforsch. **5**, 429 (1942). — Habermann, E.: (1) Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **222**, 173 (1954); (2) **225**, 158 (1955). – (3) Biochem. Z. **328**, 474 (1957). — (4) Naturwissenschaften **41**, 429 (1954). – (5) Z. ges. exp. Med. **129**, 436 (1958). — Habermann, E., u. E. Mölbert: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **222**, 203 (1954). — Habermann, E., u. W. Neumann: Z. physiol. Chem. **297**, 179 (1954). – Hajdu, S., H. Weiss u. E. Titus: J. Pharmacol. exp. Ther. **120**, 99 (1957). – Hughes, A.: Biochem. J. **29**, 437 (1935). – Neumann, W., and E. Habermann: (1) Nature (Lond.) **180**, 1284 (1957). — (2) Pharmacol. Rev. (in Vorbereitung). — Nygaard, A. P., M. U. Dianzani and F. G. Bahr: Exp. Cell. Res. **6**, 453 (1954). — Webster, G. R.: Nature (Lond.) **180**, 660 (1957). – Witter, R. F., and M. A. Cottone: Biochim. biophys. Acta **22**, 372 (1956). – Witter, R. F., A. Morrison and G. R. Shephardson: Biochim. biophys. Acta **26**, 120 (1957).

Privatdozent Dr. Ernst Habermann, Würzburg, Koellikerstraße 2,
Pharmakologisches Institut der Universität

Druck von J. P. Peter, Gebr. Holstein, Rothenburg o. d. Tbr.

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

(Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann)

Über einige Wirkungen tierischer Gifte auf Mitochondrienfunktionen

von

Ernst H a b e r m a n n

Tierische Gifte und Lysolecithin verändern Struktur und Funktion von Zellgrenzen (vgl. 9,10,11,14,18), Lysolecithin (9,10,12,23,27,28) und Melittin aus Bienengift (9,10,12) auch die Grenzflächeneigenschaften einfacher physikochemischer Systeme. So nimmt es nicht wunder, daß auch intrazelluläre Grenzflächen durch diese Substanzen beeinflußt werden. Über mikroskopisch nachweisbare Zellkernveränderungen wurde berichtet (13). Die Mitochondrienschädigung durch tierische Gifte und Lysolecithin, welche bereits aus der Schädigung der Atemkette (Literatur s. 24) zu schließen war, konnte elektronenoptisch sichtbar gemacht werden (25). Melittin erhöhte die Extinktion von Partikelpräparaten aus Rattenleber, Lysolecithin und in bestimmten Konzentrationsbereichen auch Bienengift erniedrigte sie (9,10,12). Der durch Lysolecithin bedingten Mitochondrienschwellung wirkte ATP entgegen (32).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Wirkungen tierischer Gifte auf drei Mitochondrienfunktionen geprüft: die aerobe Phosphorylierung, die Tätigkeit partikelgebundener Phosphatasen und die Bernsteinsäuredehydrierung. Wir hatten früher (7) erstmals über eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung durch Schlangengifte, Bienengift, das darin enthaltene Melittin und Lysolecithin berichtet. Inzwischen wurden die Lysolecithinwirkungen auf Oxydationsprozesse und die damit gekoppelte Phosphorylierung von anderer Seite (33) näher untersucht.

1. Hemmung phosphatübertragender Reaktionen durch tierische Gifte.

a) Methodik.

L e b e r p a r t i k e l (in Anlehnung an (3)): Zwei Ratten wurden durch Nackenschlag getötet und entblutet. Die

Lebern wurden sofort herausgeschnitten, in Eiswasser gelegt und etwa 5 Minuten später durch ein feines Kaffeesieb in 70 bis 80 ccm eiskalter Natriumbikarbonat (0,02 m)- Kaliumchlorid (0,9 %)-Lösung gepreßt, in einem vorgekühlten Multimix 15 Sekunden bei Höchsttouren homogenisiert, in ein mit Eis vorgekühltes Zentrifugenglas gegeben, 4 Minuten bei 4300 U/min (= 2800 g) zentrifugiert, das Überstehende abgegossen, der Bodensatz 2 mal mit der erwähnten Lösung nachgewaschen, schließlich in 20 ccm aufgenommen und in Eiswasser bis zum Versuch (längstens 1 Stunde) aufbewahrt. Phasenkontrastmikroskopisch fanden sich in einem solchen Präparat keine intakten Leberzellen oder zellgroße Bindegewebsbestandteile mehr, sondern im wesentlichen ovale, zum Teil agglutinierte Partikel von Mitochondriengröße (1 bis 2 µ Durchmesser) und Zellkerne, sowie vereinzelt Erythrozyten.

M i t o c h o n d r i e n (in Anlehnung an (29)): Eine eisgekühlte Rattenleber wurde durch ein Kaffeesieb in 30 ccm 0,25 m Rohrzuckerlösung gepreßt und 2 min in einem Homogenisator aus Plexiglas bei 1000 U/min zerkleinert. Nun wurde 5 min bei 700 g zentrifugiert, das Sediment 1 mal mit ca. 10 ccm Rohrzuckerlösung nachgewaschen, das kombinierte Überstehende 10 min bei 5000 g zentrifugiert und 1 mal nachgewaschen. Schließlich suspendierte man die Mitochondrien in 10 - 20 ccm Rohrzuckerlösung und dekantierte von gelegentlich beobachteten, schnell sedimentierenden Klümpchen. Phasenkontrastmikroskopisch enthielten die Präparate praktisch keine Erythrozyten und nur vereinzelt Zellkerne. Die Mitochondrien waren rundlich und nicht agglutiniert. Die größten unter ihnen besaßen einen Durchmesser von ca. 1 - 2 µ. Sämtliche benutzten Gläser und Lösungen waren auf ca. 0 Grad vorgekühlt.

H e x o k i n a s e (in Anlehnung an (21)): 500 g Bäckerhefe wurden mit 30 ccm Toluol 2 Stunden im 37°-Wasserbad autolysiert, dann auf 10-12° abgekühlt; nach Zusatz von 500 ccm 1%iger Glukoselösung ließ man ca. 20 Stdn. im Eisschrank stehen und zentrifugierte dann 10 Minuten bei 10 000 U/min (= 12 000 g). Das auf 0 Grad vorgekühlte Überstehende wurde mit dem gleichen Volumen eiskalten Alkohols allmählich versetzt und blieb 1 Std. im Eisschrank. Dann wurde 5 min bei 4200 U/min (= 2700 g) zentrifugiert, der Niederschlag mit 75 ccm Wasser verrieben und 2 Stdn. stehen gelassen, dann 10 min bei 10 000 U/min zentrifugiert; die überstehende Lösung, welche das Enzym enthielt, war bei -8 bis -10° mindestens drei Wochen lang haltbar. Die Hexokinase-Ausbeute betrug beispielsweise bei einem Ansatz 50 E/g Hefe bzw. 330 E/ccm Hexokinaselösung. Den unten näher beschriebenen Phosphorylierungsansätzen wurden hiervon je 33 Einheiten Hexokinase zugesetzt. Es konnten also in der Minute ca. 1,5, während der Versuchsdauer (in der Regel 15 Minuten) ca. 22 Mikromole Glukose phosphoryliert werden. Dabei ist die im Mitochondrienpräparat selbst evtl. enthaltene Hexokinase noch nicht eingerechnet.

Von den sonstigen Reagentien wurden Glukose (z.A.), Magnesiumchlorid (z.A.), Natriumfluorid (purum) und Glutaminsäure von der Firma M e r c k bezogen, Adenosin-5-Monophosphorsäure von der Firma S c h u c h a r d t .

Lysolecithin wurde nach Magistris (19) aus mit Bienengift bebrütetem Eigelb gewonnen und durch Chromatographie an Aluminiumoxyd (Merck) mit 96% Äthanol weiter gereinigt. Bienengift

(gereinigt) verdankten wir der Fa. H. Mack Nachf., Illertissen. Natives, vorsichtig getrocknetes Bienengift wurde von uns selbst gewonnen. Die Schlangengifte stammten von der Fa. Basilisk, Basel. Fraktion I von Bienengift (= Melittin) wurde von [G.F.] Fischer und W.P. Neumann (5) durch Chromatographie an Cellulose aus gereinigtem Bienengift gewonnen.

Die Bestimmung der Hexokinaseaktivität erfolgte manometrisch in Warburg-Gefäßen in Anlehnung an das Verfahren von BERGER, SLEIN, COLOWICK und CORI (1): ins Hauptgefäß kamen 0,2 ccm 0,5 m Glukose + 1,5 ccm 0,054 m Natriumbikarbonat + 0,3 ccm Adenosintriphosphat (Schuchardt) + 0,5 ccm 0,04 m Magnesiumchlorid, in den Seitenarm 0,3 ccm Hexokinaseverdünnung. Die Gasphase enthielt 95% Stickstoff und 5% Kohlendioxyd. Bei 30 Grad betrug die Schüttelfrequenz 120/min. In Kontrollen ohne Glukosezusatz war unter den gewählten Bedingungen auch in der unverdünnten Hexokinasesuspension keinerlei Adenosintriphosphataseaktivität nachweisbar.

Zur Bestimmung der oxydativen Phosphorylierung kamen ins Hauptgefäß 0,1 ccm 0,15 m Glutamat in Wasser + 0,1 ccm 0,1 m Magnesiumchlorid in Wasser + 0,1 ccm Hexokinase + 0,4 ccm Giftlösung in 0,85%iger Kochsalzlösung + 0,4 ccm Mitochondriensuspension, in den Seitenarm 0,1 ccm 0,02 m Adenosinmonophosphat in m/15 Phosphatpuffer nach SÖRENSEN p_H 7,2 + 0,2 ccm Phosphatpuffer + 0,05 ccm 0,4 m Natriumfluorid in ^{m}Phosphatpuffer + 0,05 ccm 0,5 m Glukose in Phosphatpuffer. Das zentrale Gefäß enthielt 0,2 ccm 20%ige Kalilauge mit Absorptionspapier. Die Warburggefäße wurden leer in Eiswasser gesetzt, nach Einpipettieren der Lösungen einzeln an den Manometern befestigt und sofort wieder in Eiswasser eingehängt. Von dort kamen sie zu definierter Zeit in den auf 30 Grad eingestellten Thermostaten. Als Gasphase diente Luft. Nach genau 10 Minuten wurden die Hähne geschlossen und der Inhalt des Seitenarmes zugekippt. Der Sauerstoffverbrauch wurde alle 5 min abgelesen. Nach genau 15 Minuten wurden die Kölbchen zum Abstoppen der Reaktion wieder ins Eisbad gebracht, das Absorptionspapier herausgenommen und der Inhalt mit 5 ccm 7%iger Trichloressigsäurelösung versetzt. Hierbei wurde der Seitenarm mit ausgespült, nicht dagegen das Zentralgefäß. Nach mindestens 10 min wurde filtriert. Vom Filtrat wurde 1 ccm in ein 25 ccm-Meßkölbchen zu 10 ccm Wasser gegeben, 5 ccm Ammonmolybdat-Lösung (25 g Ammonmolybdat in 500 ccm Schwefelsäure, hergestellt aus einem Teil konzentrierter Schwefelsäure + 9 Teilen Wasser) sowie 1 ccm Metol-Lösung (0,5 g Metol in 195 ccm 15%iger Natriumbisulfitlösung + 5 ccm 20%iger Natriumsulfitlösung) zugesetzt und auf 25 ccm mit Wasser aufgefüllt. Dann wurde 5 min auf 37° erwärmt und anschließend in Wasser von Zimmertemperatur abgekühlt. Kontrollen mit Standard-Phosphatmengen liefen gleichzeitig mit. Eine geringe Sauerstoff-Freisetzung (6 cmm) bei Zukippen des Inhalts des Seitenarmes setzte man bei der Auswertung in Rechnung. Phosphat- und Sauerstoffaufnahme wurden in γ-Atomen ausgedrückt und ihr Verhältnis in üblicher Weise als P : O - Quotient dargestellt.

b) Zur Frage des Einflusses tierischer Gifte auf Hexokinase.

Zunächst mußte geklärt werden, ob tierische Gifte die Hexokinaseaktivität beeinflussen; in diesem Fall wären nämlich

Aussagen über Giftwirkungen auf das Phosphorylierungssystem selbst wegen der Veränderung des benutzten Indikatorsystems nicht ohne weiteres möglich gewesen.

Wir gaben daher ins Hauptgefäß 0,2 ccm 0,5 m Glukose + 1,5 ccm 0,054 m Natriumbikarbonat + 0,8 ccm 0,02 m Adenosintriphosphat + 0,5 ccm 0,04 m Magnesiumchlorid und in den Seitenarm 1/20 verdünnte Hexokinaselösung, welche bei Versuch I und II der Tabelle 1 kurz zuvor mit den verschiedenen Giften (in elffacher Konzentration gegenüber der im endgiltigen Ansatz) versetzt worden war; beim III. Versuch wurde das Gift ohne vorherigen Kontakt mit Hexokinase ins Hauptgefäß gegeben. Reaktionstemperatur: 30 Grad; Stickstoff (95%)-Konlendioxyd (5%)-Atmosphäre. Gesamtvolumen der Ansätze: 3,3 ccm.

Wie Tabelle 1 zeigt, hemmen Bienengift, Melittin aus Bienengift und Nigricollis-Gift sämtlich unser Hefehexokinase-Präparat. Bei Bienengift ist dies nur dann deutlich, wenn sich das Gift vorher in Kontakt mit Hexokinase befand. Die Fermentlösung gibt mit hemmenden Konzentrationen von Melittin, gereinigtem und nativem Bienengift sowie Nigricollis-Gift Trübungen Die Ursache der Hexokinase-Hemmung dürften basische Bestandteile der Gifte sein, da Protaminsulfat ebenfalls als starker Inhibitor fungiert. Bei unseren weiter unten beschriebenen Versuchen über die oxydative Phosphorylierung spielt der beschriebene Effekt wahrscheinlich keine entscheidende Rolle, da wir hierbei mit geringeren Giftmengen und mit der 6,6 fachen Hexokinasemenge pro Ansatz arbeiteten. Inwieweit er vielleicht bei der lokalen Schädigung durch Schlangenbiß oder Bienenstich beteiligt ist, sei dahingestellt. Es treten ja in der Nähe der Biß- bzw. Stichstelle Giftkonzentrationen auf, welche weit über den von uns im Hexokinase-Ansatz angewandten liegen.

Tab. 1. Hexokinasegehalt durch tierische Gifte.

Ansätze: siehe Text.

Versuch I		Versuch II		Versuch III	
Zusatz (End-Konz.)	cmm CO_2/ 20 min b. 30°	Zusatz (End-Konz.)	cmm CO_2/ 20 min b. 30°	Zusatz (End-Konz.)	cmm CO_2/ 20 min b. 30°
giftfreier Ansatz	54	giftfreier Ansatz	47,5	giftfreier Ansatz	64
Melittin 1:4400	20,5[1]	Melittin 1:44000	42,5	ger.Bienen-gift 1:6600	59
ger.Bienen-gift 1:4400	27[1]	ger.Bienen-gift 1:44000	51,5	ger.Bienen-gift 1:66000	63
Bienen-Nativ-gift 1:4400	31,5[1]	Nigricollisgift 1:44000	34,5	ger.Bienen-gift 1:660000	65
Nigricollis-gift 1:11000	13[1]	Nigricollisgift 1:440000	41	Hexokinase- u.giftfreier Ansatz	7,5
Nigricollis-gift 1:110000	39				
Nigricollisg. 1:1100000	48				
Nigricollisg. 1:11 Mill.	56				
Protaminsulf. 1:4400	8,5				
Hexokinase- u. giftfreier Ansatz	1,0				

1) Trübung.

c) Zur Frage der Adenosintriphosphatphatase- und Hexokinase-Aktivität tierischer Gifte.

Auch ein stärkerer Gehalt der untersuchten Gifte an Adenosintriphosphatase und Hexokinase hätte die Bestimmung der oxydativen Phosphorylierung gestört. Aus diesem Grunde wurde der Gehalt an diesen Fermenten in den Giften von Naja nigricolli (als Colubride), Vipera armodytes (als Viperide) und Crotalus terrificus (als Crotalide) ermittelt.

Die Hexokinasebestimmungen erfolgten in der oben beschriebenen Weise; in den Seitenarm wurde die Giftlösung in 0,027 m Natriumbikarbonatlösung mit 0,43%igem Kochsalzzusatz gegeben.

Zur Adenosintriphosphatasebestimmung diente der gleiche Ansatz, nur wurde statt Glukose Kochsalzlösung zugesetzt.

Ammodytes- und Crotalusgift vermochten in Bestätigung von Angaben von ZELLER (34) Adenosintriphosphorsäure zu spalten; die Aktivität von Nigricollisgift war für eine zuverlässige Auswertung zu gering. Hexokinaseaktivität konnte bei keinem der Gifte nachgewiesen werden (Tab. 2). Die vorhandene Adenosintriphosphatase ist zum mindesten beim Nigricollis- und Ammodytes-Gift im Verhältnis zur oxydativen Phosphorylierung so schwach, daß sie bei deren Bestimmung keine Rolle spielt. Außerdem kann sie durch Erhitzen ausgeschaltet werden((2); eigene Versuche), ohne daß gleichzeitig die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung ausfällt (s. unten).

Tab. 2. Manometrische Bestimmung von Adenosintriphosphatase und Ausschluß von Hexokinase in Schlangengiften.

Ansätze: s. Text.

Giftendkonzentration		cmm CO_2 binnen 40 min bei 30° in Ansatz. mit Glukose	ohne Glukose
Nigricollisgift	1:11000	5	3
"	1:110000	- 1,5	- 1
Ammodytesgift	1:11000	10	12
"	1:110000	+ 1	0
Terrificusgift	1:11000	39	41
"	1:110000	5	-

d) Einfluß tierischer Gifte auf Atmung und oxydative Phosphorylierung.

Sämtliche Versuche wurden mehrmals durchgeführt, und zwar zunächst mit Leberhomogenat, später mit der Partikelsuspension nach CRANE und LIPMANN (3), welche sich ihrerseits wiederum an das von GREEN und Mitarbeitern (6) benutzte Verfahren zur Herstellung des Cyclophorasesystems anlehnt. Da der P:O-Quotient bei der Zellpartikel-Präparation wesentlich höher lag als beim Homogenat, und da ferner beim Homogenat der größte Teil des Sauerstoffverbrauches auf die Verbrennung von endogenem Substrat entfiel, erscheinen uns die Versuche mit der Partikelsuspension als wesentlich beweiskräftiger. Die verwendeten Schlangengifte wurden vor Zugabe bei einem Teil der Versuche in physiologischer Kochsalzlösung 15 Minuten auf 98 Grad erhitzt, um eine Reihe von thermolabilen, eventuell inter-

ferierenden Enzymen, wie Protease, Aminosäureoxydase, Koagulase, Adenosintriphosphatase und andere Phosphatasen auszuschalten.

(a) Versuche mit Bienen-, Ammodytes- und Nigricollisgift (vgl. Tab. 3, 5, 6, 7 und 8).
Die untersuchten Gifte minderten sowohl die Sauerstoff- als auch die Phosphataufnahme; letztere wurde aber stets stärker gehemmt als die des Sauerstoffs. Das entkoppelnde Prinzip ist relativ thermostabil (Tab. 6). Die zur Entkopplung führende Reaktion ist zeitabhängig, wie unsere Versuche mit erhitztem Ammodytesgift zeigten (Tab. 8).

(b) Versuche mit Melittin und Lysocithin (vgl. Tab. 3, 4, 5). Sie zielten auf eine Analyse des Wirkungsmechanismus ab und galten der Entscheidung, ob das entzündungserregende und permeabilitätssteigernde Melittin (8) oder aber Phospholipase A bzw. deren Reaktionsprodukt Lysocithin für Atmungs- und Phosphorylierungshemmung verantwortlich sind. Es ergab sich jedoch, daß sowohl Melittin als auch Lysocithin zur Entkopplung fähig sind. Der Effekt von gereinigtem Bienengift, das sowohl Melittin als auch Phospholipase A enthält, kann aber nicht auf Melittin allein bezogen werden, da dieses ca. 20 bis 40 mal weniger wirksam ist als gereinigtes Gift (Tab. 3). Ebensowenig kann aber auch die Entkopplung und Atmungshemmung durch Melittin nur auf eine Verunreinigung mit Phospholipase A bezogen werden, da das benutzte Präparat nach dem Dotterkoagulationstest weniger als 0,5 % der Phospholipaseaktivität des Gesamtgiftes besitzt; nach der Fähigkeit, Partikelsuspensionen zu klären, wären es sogar weniger als 0,5 °/oo; die benötigten Konzentrationen liegen bei Melittin immer noch erheblich unter jenen, die am Kaninchenauge Schmerz und Entzündung erzeugen (22).

Als atmungs- und phosphorylierungshemmendes Prinzip muß vor allem Phospholipase A in Erwägung gezogen werden, zumal bereits bekannt ist, daß sie Desmoenzyme - und um solche handelt es sich in unserem Falle - zu inaktivieren vermag (BRAGANCA und QUASTEL (2)). Auch die beiden Spaltprodukte von Lecithin, nämlich Lysocithin (vgl. auch WITTER, MORRISON u. SHEPARDSON (33)) und Ölsäure, vermögen zu entkoppeln (s.Tab. 5 und 9). Außerdem -

und auch dies spricht für fermentativen Charakter - schreitet die Reaktion mit der Dauer der Vorinkubation fort (Tab. 8). Schließlich ist der Prozeß der oxydativen Phosphorylierung mit lipoproteinartigen Bestandteilen der Rattenlebermitochondrien verknüpft (COOPER, DEVLIN u. LEHNINGER (2a)); Abbau von Mitochondrienlipoiden durch Phospholipase A ist schon länger bekannt (Literatur s. (24)).

Tab. 3. Sauerstoff- und Phosphataufnahme von Leberpartikeln nach Inkubation mit Bienengift bzw. Melittin.

Ansätze: s. Methodik. Reaktionszeit 15 min.
Trockengewicht der Partikel: 12 mg/Ansatz.

Gift (Endkonz.)	γA O	γA P	P/O
ger. Bienengift			
1 : 375 000	1,88	0	0
1 : 750 000	5,90	6,0	1,05
1:: 1500 000	7,70	13,2	1,72
1 : 3000 000	8,46	15,5	1,83
1 : 6000 000	8,0	15,5	1,94
Melittin			
1 : 18 700	8,6	10,8	1,26
1 : 37 500	8,14	12,6	1,55
1 : 75 000	8,96	16,8	1,86
1 : 150 000	8,46	16,2	1,91
giftfreier Ansatz	7,90	15,2	1,92

Tab. 4. Sauerstoff- und Phosphataufnahme von Leberpartikeln nach Inkubation mit Dinitrophenol bzw. Melittin.

Ansätze: s. Methodik. Reaktionszeit 10 min. Trockengewicht der Partikel: 13 mg/Ansatz.

Gift (Endkonz.)	γA O	γA P	P/O
Dinitrophenol			
0,000266 m	5,64	0,24	0,04
0,0000665 m	7,86	4,12	0,52
0,0000166 m	7,70	14,0	1,82
0,00000416 m	7,26	16,7	2,30
Melittin			
1 : 7 500	1,0	0	0
1 : 15 000	3,32	0	0
1 : 30 000	6,66	12,4	1,86
1 : 60 000	6,80	17,4	2,56
giftfreier Ansatz	6,52	18,4	2,82

Tab. 5. Sauerstoff- und Phosphataufnahme nach Inkubation mit Bienengift bzw. Lysocithin.

Reaktionszeit 15 min; Trockengewicht der Partikel: 12 mg/Ansatz.

Gift (Endkonz.)	γA O	γA P	P/O
ger. Bienengift			
1 : 375 000	0,2	0	0
1 : 750 000	6,04	8,97	1,50
1 : 3000 000	6,76	13,6	2,16
1 : 6000 000	6,78	14,1	2,08
Lysocithin			
1 : 1 875	0	0	0
1 : 3 750	5,50	7,52	1,37
1 : 7 500	7,36	13,9	1,89
1 : 15 000	7,60	16,2	2,13
giftfreier Ansatz	6,34	13,8	2,17

Tab. 6. Phosphorylierungshemmung durch unerhitztes und erhitztes Ammodytesgift.

Dauer des Erhitzens 15 min (98°).
Reaktionszeit 10 min; Trockengewicht der Partikel: 12 mg/Ansatz.

Endkonzentration	γA O	γA P	P/O	γA O	γA P	P/O
1 : 9 380	4,66	5,8	1,25	-	-	-
1 : 18 750	-	-	-	5,20	0	0
1 : 37 500	4,56	9,7	2,12	5,38	9,2	1,7
1 : 75 000	5,28	13,5	2,56	4,04	6,75	1,68
1 : 150 000	-	-	-	5,28	11,1	2,13
	erhitztes Gift			nicht erhitztes Gift		
giftfreier Ansatz	5,20	13,5	2,60			

Tab. 7. Sauerstoff- und Phosphataufnahme von Leberpartikeln nach Inkubation mit Nigricollisgift.

Reaktionszeit 15 min; Trockengewicht der Partikel: 10 mg/Ansatz

Endkonzentration	γA O	γA P	P/O
1 : 75 000	0,4	0	0
1 : 150 000	0,4	0	0
1 : 300 000	0,2	0	0
1 : 600 000	4,3	2,9	0,68
1 : 1200 000	4,56	7,3	1,59
1 : 2400 000	4,76	10,6	2,24
giftfreier Ansatz	4,94	12,6	2,55

Tab. 8. Zeitabhängigkeit der Oxydations- und Phosphorylierungshemmung durch Ammodytesgift.

Gift vorher 15 min auf 98° erhitzt. Reaktionszeit durchgehend 15 min; Vorinkubation bei 30° mit Substrat, aber ohne Phosphat. Trockengewicht der Partikel 6 mg/Ansatz.

Endkonzentration	10 min vorbebrütet			20 min vorbebrütet		
	γA O	γA P	P/O	γA O	γA P	P/O
1 : 7 500	2,06	0	0	0	0	0
1 : 15 000	4,12	7,25	1,76	2,42	0	0
1 : 30 000	4,12	7,25	1,76	2,60	4,35	1,67
1 : 60 000	4,2	10,2	2,43	2,42	5,8	2,39
giftfreier Ansatz	4,56	11,6	2,54	3,32	8,2	2,47

Endkonzentration	30 min vorbebrütet		
	γA O	γA P	P/O
1 : 7 500	0,4	0	0
1 : 15 000	0	0	0
1 : 30 000	1,6	0	0
1 : 60 000	2,94	0,48	0,16
1 : 120 000	3,04	3,87	1,28
giftfreier Ansatz	2,86	4,35	1,52

Tab. 9. Phosphat- und Sauerstoffaufnahme von Leberpartikeln nach Inkubation mit Desoxycholsäure, Ölsäure und Protaminsulfat.

Reaktionszeit 15 min; Trockengewicht der Partikel: 11 mg/Ansatz.

Endkonzentration	γA O	γA P	P/O
Desoxycholsäure			
1 : 7 500	0,2	0	0
1 : 15 000	4,3	6,3	1,47
1 : 30 000	7,16	16,0	2,24
1 : 60 000	8,06	19,8	2,46
1 : 120 000	8,14	19,8	2,43
Ölsäure			
1 : 1 875	1,08	0	0
1 : 3 750	3,22	0	0
1 : 7 500	5,64	9,7	1,72
1 : 15 000	6,62	16,1	2,43
1 : 30 000	6,90	17,9	2,60
Protaminsulfat			
1 : 937	0,4	0	0
1 : 1875	4,22	0,97	0,23
1 : 3750	8,14	8,22	1,01
1 : 7500	8,14	17,9	2,20
giftfreier Ansatz	8,32	19,6	2,35

2. Über die Beeinflussung phosphatabspaltender Reaktionen durch tierische Gifte.

Die korpuskulären Zellbestandteile, insbesondere die Mitochondrien, enthalten eine ganze Reihe von Phosphatasen. So wurde z.B. von KIELLEY und KIELLEY (16) eine partikelgebundene Adenosintriphosphatase in Lebermitochondrien beschrieben. Im Rahmen unserer Problemstellung versuchten wir zu klären, ob tierische Gifte neben den phosphatbindenden (s. vorhergehenden Abschnitt) auch die phosphatabspaltenden Fähigkeiten der Mitochondrien zu beeinflussen vermöchten; denn auch auf diesem Wege sollte eine Änderung des Zellspiegels an energiereichem Phosphat möglich sein. Gleichzeitig wäre damit ein neuer Beweis für die große Rolle der Strukturschädigung durch tierische Gifte sowie für die Bedeutung intakter Strukturen in Bezug auf Phosphataseaktivität gegeben.

a) Zur Methodik.

Um einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden sämtliche Versuche bei demselben pH (7,5) und der gleichen Magnesiumchlorid-Konzentration (0,005 m) angesetzt. Ansätze: 0,5 ccm 0,05 m Veronal-Salzsäure-Puffer pH 7,5 mit 0,02 m Magnesiumchlorid + 0,5 ccm Giftlösung im gleichen Puffer, aber ohne Magnesiumchlorid, + 0,5 ccm einer 0,02 m, neutralisierten Lösung des Natriumsalzes von Adenosintriphosphorsäure (ATP; Präparat der Firma Schuchardt), Adenosinmonophosphorsäure (AMP; Präparat der Firma Schuchardt), Pyrophosphat (Merck) oder Phenolphthaleinphosphat (Boehringer (Mannheim)) in physiologischer Kochsalzlösung + 0,5 ccm Partikelsuspension nach (3) in Kaliumchlorid (0,9 %)-Natriumbikarbonat (0,02 m)-Lösung, bzw. Mitochondriensuspension nach (29) in 0,25 m Rohrzuckerlösung. Nach 30 min währender Inkubation bei 30° wurde kurz mit Wasser von Zimmertemperatur gekühlt; dann wurden 2 ccm 10%ige Trichloressigsäurelösung zugesetzt und die Ansätze filtriert. Die Phosphatbestimmung im Filtrat erfolgte wie oben angegeben. Das benutzte Ammodytesgift wurde vor Versuchsbeginn 15 min auf 98° erhitzt, um darin enthaltene Phosphatasen zu inaktivieren.

Zunächst mußte das pH-Optimum der in unserem Ansatz enthaltenen Phosphatasen ermittelt werden. Wie aus Tab. 10 hervorgeht, besitzt die AMP-Spaltung im untersuchten Bereich (pH 6,8 - 9,5) kein eindeutiges Maximum; die ATP-Spaltung nimmt mit steigendem pH zu, die Pyrophosphat- und Phenolphthaleinphosphatspaltung dagegen ab. Wir wählten für unsere weiteren Versuche den pH-Wert 7,5, insbesondere um einen Vergleich mit den in der Nähe dieses pHs durchgeführten Phosphorylierungs- und Dehydrasenversuchen zu ermöglichen.

Tab. 10. pH-Abhängigkeit der Phosphatasen-Aktivität im Partikelpräparat.

Ansätze: 0,5 ccm 0,02 m Magnesiumchlorid in physiologischer Kochsalzlösung + 0,5 ccm Veronalpuffer des angegebenen pH's + 0,5 ccm Partikelsuspension in Kaliumchlorid-Natriumbikarbonatlösung + 0,5 ccm 0,02 m Substrat in physiologischer Kochsalzlösung; 30 min bei 30°. Trockengewicht der Partikel in den ATP- und Pyrophosphatansätzen: 2,5 mg/Ansatz, sonst 7,5 mg/Ansatz.

p_H	Phosphatfreisetzung (γm) aus			
	ATP (97% rein)	AMP	Pyrophosphat	Phenolphthaleinphosphat
6,8	5,3	4,5	2,95	1,0
7,5	5,3	5,0	2,3	0,75
8,0	5,6	5,0	2,3	0,3
8,5	5,75	5,0	1,35	0,15
9,0	6,0	5,0	1,0	0,05
9,5	6,4	4,5	-	0,05

Außerdem mußte vor Beginn der eigentlichen Versuche der Leerwert der auf verschiedene Weise hergestellten Partikel- bzw. Mitochondrienpräparate in An- und Abwesenheit der zu untersuchenden Gifte gemessen werden. Eine Wiedergabe desselben erübrigt sich, da er in keinem Falle signifikant über dem der Reagentien lag.

b) Änderung der Phosphatasenaktivität von Mitochondriensuspensionen unter dem Einfluß von Ammodytesgift, Bienengift, Melittin und Lysolecithin.

Die AMP-Spaltung durch Mitochondrienpräparate wurde durch Lysocithin, Melittin und Ammodytesgift verstärkt (Tab. 11); dagegen wurde die ATP- und Pyrophosphatspaltung bei kurzdauernder Inkubation nicht signifikant beeinflußt. Bei länger dauernder Vorinkubation dagegen wurde die mitochondriengebundene Pyrophosphatase sowohl durch erhitztes Ammodytesgift (Tab. 12) als auch durch Lysocithin (vgl. Abschnitt c) partiell gehemmt. Die Inaktivierung durch erhitztes Ammodytesgift nahm mit der Zeit zu (Tab. 12).

Tab. 11. Aktivierung der Adenosinmonophosphat-Spaltung durch Mitochondrien unter dem Einfluß von Lysocithin, Melittin und Ammodytesgift.

Ansätze: s.Methodik. Versuchsdauer 30 min. Trockengewicht der Partikel 6,7 mg/Ansatz. Aktivität der Kontrolle: 2,75 µm P abgespalten.

Lysocithin		Melittin		Ammodytesgift (ernitzt)	
Endkonz.	µm P	Endkonz.	µm P	Endkonz.	µm P
1: 2000	3,5	1: 16000	3,7	1: 4000	3,7
1: 20000	2,7	1: 160000	2,7	1: 40000	2,8
1:200000	2,6	1:1600000	2,5	1:400000	2,6

Eine Sonderstellung nahmen Versuche mit einem wenig gereinigten ATP-Präparat ein, in welchem etwa 1/6 des Gesamtphosphates direkt bestimmbar war. Die Spaltung dieses Präparates war durch unsere Substanzen erheblich stärker aktivierbar als die des besser gereinigten, und zwar war dies besonders deutlich bei Verwendung des Partikelpräparates, jedoch war auch bei Verwendung von Mitochondrien durch eine Bienengift-Endverdünnung 1:40 000 eine Aktivierung um 42% unter den üblichen Bedingungen (s. Methodik) zu erzielen. Möglicherweise wird neben der AMP-Spaltung auch die von Adenosindiphosphat (Apyrase) durch Gifte aktiviert, was Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

Tab. 12. Inaktivierung der Pyrophosphatspaltung durch Mitochondrien unter dem Einfluß von erhitztem Ammodytesgift.

Ansätze: 0,5 ccm 0,02 m Magnesiumchloridlösung in 0,05 m Veronalpuffer pH 7,5 + 0,5 ccm Giftlösung in 0,05 m Veronalpuffer + 0,5 ccm Mitochondriensuspension in 0,25 m Rohrzuckerlösung; 15 min bei 30° bzw. nicht vorinkubiert; dann Zusatz von 0,5 ccm 0,02 m Pyrophosphatlösung; 30 min bei 30°; Weiterbehandlung wie üblich. Trockengewicht der Partikeln 4,3 mg/Ansatz.

Giftzusatz (Endkonzentration)	keine Vorinkubation µm P freigesetzt	15 min vorink. µm P freigesetzt
1 : 4 000	4,8	2,15
1 : 16 000	5,5	2,15
1 : 64 000	5,7	2,7
1 : 256 000	-	3,65
1 :1024 000	-	3,75
1 :4096 000	-	3,80
Kontrolle	5,5	3,9

c) Löslichkeitserhöhung partikelgebundener Phosphatasen durch Ammodytesgift und Lysocithin.

Aus den bisher angeführten Versuchen war zu schließen, daß bestimmte, in Mitochondrien enthaltene Phosphatasen durch tierische Gifte aktiviert oder inaktiviert werden können. Im folgenden prüften wir nun, ob gleichzeitig mit der Funktionsänderung auch eine Veränderung physikalischer Eigenschaften des Fermentträgers auftritt.

5 ccm Mitochondriensuspension in Rohrzuckerlösung wird mit 5 ccm Lysocithin- bzw. Ammodytesgiftlösung 1:500 bzw. 1:1000 (das Ammodytesgift wurde vorher zur Ausschaltung von Phosphatasen 15min auf 98° erhitzt) in 0,25 m Rohrzuckerlösung 30 min bei 30° gehalten, dann 10 min bei 10 000 U/min = 12 000 g zentrifugiert; das opaleszente Überstehende wird bis auf etwa 1 ccm abgehebert und der Bodensatz im Ausgangsvolumen Rohrzuckerlösung resuspendiert. In gleicher Weise wird eine giftfreie Kontrolle behandelt. Anschließend Testung auf ATP- und Pyrophosphatspaltung wie oben angegeben.

Wie Tab. 13 zeigt, tritt bei länger dauernder Einwirkung von Ammodytesgift und Lysocithin auf Mitochondrien ein deutlicher Unterschied zwischen dem Verhalten der ATP- und Pyrophosphatspaltung zutage: beide Aktivitäten werden schwerer sedimentierbar. Die Pyrophosphatase wird jedoch, wie nach Tab. 12 zu erwarten war, gleichzeitig partiell inaktiviert.

Tab. 13. Aktivitäts- und Löslichkeitsänderung von Mitochondrienphosphatasen nach Vorbebrütung mit Ammodytesgift und Lysocithin.

Versuchsausführung: s. Text.

Vorbebrütung mit (Endkonzentration)	Phosphatfreisetzung (µm P) aus ATP			aus Pyrophosphat		
	Überstehend.	Sediment	Σ	Überstehend.	Sediment	Σ
Ammodytesgift, erhitzt 1:2000	1,9	4,6	6,5	3,8	2,6	6,4
Kontrolle*)	1,0	5,4	6,4	1,4	9,4	10,8
Lysocithin 1:1000	6,1	1,5	7,6	1,8	0,1	1,9
Kontrolle**)	1,2	4,6	5,8	0,8	3,6	4,4

*) Trockengewicht der Partikel: 3,7 mg/Ansatz
**) Trockengewicht der Partikel: 2,55 mg/Ansatz

d) Zur Frage des Wirkungsmechanismus der Phosphatasen-aktivierung.

Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten der Aktivierung strukturgebundener Fermentreaktionen denkbar: Es kann das Ferment bzw. die Fermentkette selbst zu verstärkter Tätigkeit angeregt werden oder es kann durch Erhöhung der Permeabilität das Substrat in größerer Menge an den Reaktionsort herangebracht werden. Daß letzteres durchaus in Betracht gezogen werden muß, ließ sich mit dem folgenden Modellversuch beweisen, bei welchem statt der Mitochondrien Erythrozyten benutzt wurden.

Bei Hämolyse nimmt bekanntlich die Aktivität bestimmter Phosphatasen zu (17, 26, 31). Zur Beantwortung der Frage, ob dies auch bei den von uns gewählten Bedingungen und Substraten der Fall ist, wurden Erythrozyten von Mensch und Ratte dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, davon je 1 ccm Erythrozytenmasse mit 5 ccm Wasser 10 min bei 38° hämolysiert, die menschlichen Blutzellen 10 min bei 10 000 g zentrifugiert und das Sediment in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Bei den Kontrollversuchen wurde zu den Erythrozyten statt Wasser Kochsalzlösung zugefügt. Ansätze: s. Methodik.

Intakte Erythrozyten von Mensch und Ratte spalten die verschiedenen Substrate nur schwach. Hämolysiert man sie dagegen, so steigt die Phosphatasentätigkeit enorm an. Die aktiven Zellkomponenten sind unter unseren Bedingungen nicht sedimentierbar. Die geringe Restaktivität des Sediments möchten wir darauf zurückführen, daß es (um Wirksamkeitsverluste zu vermeiden) nicht weiter ausgewaschen wurde (Tab. 14). Möglicherweise beruht auch die Aktivierung der Mitochondrienphosphatasen darauf, daß infolge Permeabilitätserhöhung die Diffusion der Substrate an die Reaktionsorte begünstigt wird. Zu einer ähnlichen Deutung der Aktivierung der sauren Phosphatase von Mitochondrien durch Clostridium perfringens-Gift kamen MACFARLANE u. HARRIS (18a). Natürlich könnten umgekehrt auch die Enzyme von ihren ursprünglichen Positionen durch den "Lösungsvermittler" Lysocithin freigesetzt werden.

Tab. 14. Phosphatasen-Aktivität von Erythrozytenbestandteilen nach Hypotonie-Hämolyse.

Substrat	Erythrozyten v. Mensch. intakte Zellen	Überstehendes	Sediment	Erythrozyten der Ratte intakte Zellen	Hämolysat
Pyrophosphat	-0,1	8,2	1,7	0,5	19,0
Phenolphthaleinphosphat	0,1	1,5	0,3	1,05	5,3
ATP	0,25	0,4	0,55	0,15	1,2
AMP	0	0	0	0,3	0,1

Versuchsanordnung: s. Text. Die Zahlen geben das freigesetzte Phosphat (Mikromole) wieder.

3. Zur Beeinflussung dehydrierender Reaktionen durch tierische Gifte und ihre Komponenten.

Ebenso wie die oxydative Phosphorylierung ist die Bernsteinsäuredehydrierung ein strukturgebundener Prozeß. Es ist daher verständlich, daß Bienen- und Schlangengift (Literatur s. (24)) diese Reaktion zu hemmen vermögen. Der Beweis für eine solche Inaktivierung wurde bisher mit drei Methoden geführt: anaerob mit Triphenyltetrazoliumchlorid als Indikator, ferner (ebenfalls anaerob) mittels des Ferrizyanidverfahrens von QUASTEL und WHEATLEY (26) und schließlich durch direkte Messung der Sauerstoffaufnahme von Fermentpräparaten in Anwesenheit von Bernsteinsäure. Nun spielen aber bei der Aktivitätsmessung dieses Fermentsystems zwei experimentelle Bedingungen eine entscheidende Rolle: einerseits die Art der Bindung des Fermentmoleküls an den "Trägerkomplex", andererseits die Meßmethode selbst. Beispielsweise nahm man bis vor kurzem an, daß das eigentliche Ferment "Bernsteinsäuredehydrase" überhaupt nicht von seinem kolloidalen Träger zu lösen sei; SINGER und KEARNEY (30) ist es aber gelungen, das ursprüngliche Desmoenzym in ein Lyoenzym zu verwandeln. Dabei geht allerdings gleichzeitig die Fähigkeit verloren, mit Ferrizyanid und fast allen anderen Elektronenakzeptoren zu reagieren. Nur Phenazin-Methosulfat kann noch als Indikator fungieren. Es bestehen also enge Beziehungen zwischen kolloidaler Struktur und Reaktionsvermögen der Fermentpräparate. Andererseits mißt man bei gleicher kolloidaler Struktur mit verschiedenen Elektronenakzeptoren verschiedene Umsatzgeschwindigkeiten. Gerade die Oxydation von Succinat mit Phenazin-Methosulfat als Elektronenakzeptor war durch Lysolecithin nicht hemmbar (WITTER, MORRISON u. SHEPARDSON (33)), während die Oxydation von Glutamat mit Sauerstoff (s.O.), von Succinat und β-Hydroxybutyrat mit Ferricyanid hemmbar war (WITTER, MORRISON u. SHEPARDSON (33)). Das bernsteinsäuredehydrierende System aus Leber reagiert mit Methylenblau als Akzeptor viel intensiver als mit Triphenyltetrazoliumchlorid (ZÖLLNER u. ROTHEMUND (35)). Auch nach unseren

eigenen, weiter unten näher ausgeführten Versuchen ist das gleiche Fermentpräparat in Anwesenheit von Ferrizyanid viel aktiver als in Gegenwart von Triphenyltetrazoliumchlorid. Wegen dieser grundlegenden Differenzen mußte die Dehydrasehemmung durch tierische Gifte und daraus isolierte Fraktionen mit verschiedenen Methoden an möglichst gleichartigen Fermentpräparaten untersucht werden.

a) Methodik.

Ferrizyanidverfahren: Das Partikelpräparat wurde wie Seite 1 beschrieben, dargestellt, aber anschließend mit Phosphat-Bikarbonat-Puffer pH 7,5 (0,68 % NaCl. 0,04 % KCl, 0,0125 % NaH_2PO_4 x H_2O, 0,22 % $NaHCO_3$) auf 1/15 bis 1/30 der Ausgangskonzentration verdünnt. Hiervon wurden in Thunberg-Röhrchen 1,0 ccm zu 0,5 ccm Gift-Kochsalzlösung gegeben und, wenn nicht besonders angegeben, für 20 Minuten im 30°-Wasserbad inkubiert, dann 1 Minute lang im Eisbad gekühlt. Nach Zusatz von 0,5 ccm 0,3 m Succinat und 0,5 ccm 0,5%igem Kaliumferrizyanid wurde eine weitere Minute lang auf 5 bis 8 mm Hg evakuiert, dann 30 Minuten lang ins 30°-Bad gebracht. Danach wurde der Ansatz mit 20 ccm Wasser in ein Erlenmeyer-Kölbchen gespült, davon ca. 10 ccm zum Abstoppen der Reaktion in einem Reagenzglas 5 Minuten auf 98° erwürmt, mit Wasser von Zimmertemperatur abgekühlt und filtriert. Die Extinktion des Filtrats wurde im Beckman- bzw. Unicam-Spektrophotometer bei 420 mμ und (zur Erkennung von evtl. Trübungen) bei 520 mμ bestimmt.

Vorversuche ergaben, daß das Verhältnis Ferri- zu Ferrozyanid durch Erhitzen nicht beeinflußt wird und daß Melittin von Bienengift mit Ferrizyanid in den angewandten Konzentrationen nicht direkt reagiert; das Erhitzen reicht hin, um die Aktivität der Partikelsuspension nach Beendigung der Versuche zu stoppen; vorher erhitzte Partikel reagieren in An- oder Abwesenheit von Melittin nicht mit Ferrizyanid. In Abwesenheit von Succinat kommt nur eine minimale Reduktion des Ferrizyanids zustande, und bei Benutzung höherer Ferrizyanidkonzentrationen schäumt der Ansatz beim Evakuieren stärker und die optischen Eigenschaften des Fermentpräparates ändern sich.

Formazanverfahren: Die Ansätze sind wie beim Ferrizyanidverfahren zusammengesetzt, doch wird statt 0,5%igem Ferrizyanid 1%iges Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zugesetzt. Nach Beendigung des Versuches wird mit 20 ccm Isopropylalkohol ausgespült, gut durchgeschüttelt, zentrifugiert und das Überstehende bei 490 mμ photometriert. Aus der Extinktion wird mittels einer Eichkurve die Menge des gebildeten Formazans errechnet.

Die aerobe Bestimmung erfolgt durch Messung des Sauerstoffschwundes im Warburg-Apparat.

In den Hauptraum auf 0 bis +5 Grad vorgekühlter einarmiger Warburg-Gefäße werden 1,3 ccm Partikelsuspension, 1 ccm Phosphat-Bikarbonat-Puffer (pH 7,5) bzw. Giftlösung in Puffer sowie 1 ccm 0,3 m Succinat pipettiert. Ins Zentralgefäß kommen 0,2 ccm

20%iger Kalilauge mit Absorptionspapier. Als Gasphase dient Luft. Reaktionstemperatur 30°. Bis unmittelbar vor Einsetzen in das warme Wasserbad werden die am Manometer befestigten Gefäße in eiskaltem Wasser gehalten. Equilibrierungszeit genau 10 min, Ablesung alle fünf Minuten.

b) Ergebnisse.

Es fiel auf, daß das Maximum der Dehydrasenhemmung durch Bienengift bei der Messung mittels Ferricyanid-Zusatz (Tab. 15) und unter bestimmten Bedingungen auch das Maximum der Hemmung der Bernsteinsäureoxydation bei aerober Bestimmung nicht mit der höchsten angewendeten, sondern mit einer erheblich darunter liegenden Giftkonzentration erreicht wurde. Die Möglichkeit, daß Bienengift etwa direkt mit Ferricyanid in nennenswertem Maße reagieren könnte, war durch Vorversuche ausgeschlossen worden.

Als wir nun chromatographisch gewonnenes Melittin auf sein Verhalten gegenüber dem Bernsteinsäuredehydrasen-System prüften, war das Ergebnis sehr überraschend: Melittin aktivierte in Lösungen 1:10 000 sehr stark und oft noch in Verdünnungen 1:100 000 deutlich. Variation des pH zwischen 7,0 und 8,0 brachte diesen Effekt nicht zum Verschwinden (Tab. 16). Melittin dürfte nach den Analysen von F.G. FISCHER und W.P. NEUMANN (5) bezw. F.G. FISCHER und DÖRFEL (4) keine Redox-Gruppen - zumindest keine Sulfhydrylgruppen - enthalten. Daher suchten wir eine Erklärung in seinen physikochemischen Eigenschaften. Es war uns bereits aufgefallen, daß Melittin in Partikelsuspensionen eine gewisse Trübung erzeugte und daß die Aktivierung bis zu einem gewissen Grade dieser Trübung parallel ging.

Tab. 15. Hemmung der Bernsteinsäuredehydrierung durch Bienengift (Ferrizyanidverfahren).

Ansatz: 1 ccm Partikelsuspension in Puffer pH 7,5 + 1 ccm Gift in Puffer + 1 ccm 0,3 m Succinat + 0,3 ccm 1%iges Ferricyanid (= 9,1 µm). Durchführung des Versuchs: s.Text. Trockengewicht der Partikel: 1,54 mg/Ansatz.

Gift (Endkonzentration)	Gebildetes Ferrozyanid (µm)
0	4,8
1 : 3 300	3,3 (!)
1 : 16 500	2,1
1 : 82 500	1,2
1 : 412 500	1,2
1 : 2 062 500	1,7
1 :10 312 500	5,4

Bei weiteren Versuchen setzten wir eine dem Melittin chemisch weitläufig verwandte Substanz ein, welche ebenfalls Partikelsuspensionen zu trüben vermag, nämlich Protaminsulfat. Auch dieses aktivierte die Dehydrierung im Ferrizyanidverfahren, wenn auch sehr viel schwächer. Natürlich durften nur diejenigen

Tab. 16. pH-Abhängigkeit der Aktivierung der Bernsteinsäuredehydrierung durch Melittin und Protaminsulfat.

Ansatz: siehe Text. Ferricyanidzusatz: 7,6 µm. Trockengewicht der Partikel: 0,51 mg/Ansatz.

p_H	Zusatz (Endkonz.)	gebildetes Ferrocyanid (µm)
7,0	Kontrolle	1,6
	Melittin 1 : 10 000	3,1
	Protaminsulfat 1 : 10 000	2,7
7,5	Kontrolle	0,8
	Melittin 1 : 10 000	3,0
	Protaminsulfat 1 : 10 000	1,4
8,0	Kontrolle	0,7
	Melittin 1 : 10 000	1,7
	Protaminsulfat 1 : 10 000	1,3

Protaminsulfatkonzentrationen bewertet werden, welche mit Ferricyanid noch keinen Niederschlag ergaben (Tab. 16 u. 17). Rinderserum-Albumin war in Konzentrationen zwischen 1 : 50 und 1 : 5 000 unter unseren Bedingungen ohne jeden Effekt. Nun durfte man erwarten, daß durch Melittin auch Formazanbildung und Sauerstoffaufnahme vermehrt würden. In Wirklichkeit wurde beides jedoch gehemmt (s. Tab. 17 u. 18). Wir haben also eine Substanz in der Hand, welche das Succinodehydrasen-System je nach dem gewählten Indikator inhibiert oder aktiviert. Protaminsulfat tut, wenn auch in schwächerem Maße, das gleiche; während es, wie bereits erwähnt, im Ferricyanid-Test aktiviert, hemmt es die

Formazanbildung. Die beste Deutung für diese krassen Unterschiede geht wohl davon aus, daß das zum Formazan als Endprodukt hinleitende, elektronenübertragende System der Zelle erheblich labiler ist und auch eine erheblich geringere Elektronenmenge in der Zeiteinheit überträgt als das zum Ferrocyanid führende, daß also mit den beiden Indikatoren zwei verschiedene Prozesse erfaßt werden (vgl. Tab. 17).

Tab. 17. Vergleich von Melittin, Protaminsulfat und verschiedenen Schlangengiften im Dehydrasenansatz (Ferricyanid- bzw. Formazanverfahren).

Ansätze: s. Text. Inkubationszeit für Ferricyanidansätze: 30 min, für Formazananansätze: 60 min. Trockengewicht 0,77 mg Partikel/Ansatz. Ferricyanidzusatz: 7,6 µm

Zusatz (Endkonzentration)		Ferrocyanidbildung (µm)	Formazanbildung (µm)
Kontrolle		1,9	0,066
Melittin	1 : 40 000	5,3	0
	1 : 160 000	3,1	0
	1 : 640 000	2,2	0,019
	1 : 2560 000	-	0,024
Protaminsulfat	1 : 1 000	-	0,019
	1 : 10 000	3,3	0,037
	1 : 100 000	2,5	0,052
Ammodytesgift	1 : 2 500	0,8	-
	1 : 25 000	0,7	-
Nigricollisgift	1 : 2 500	0,9	-
	1 : 25 000	0,9	-
Crotalus-terrificus-Gift	1 : 2 500	0,5	-
	1 : 25 000	1,2	-

Die Aktivierung der Ferricyanidreaktion möchten wir auf eine Stabilisierung der Mitochondrienstrukturen[1)] zurückführen; denn wir beobachteten gelegentlich, daß mit Melittin versetzte Mitochondrienpräparate noch tagelang dehydrierten, während die Reaktion in den Kontrollansätzen nicht bis zur vollständigen Entfärbung weiter lief.

1) Two types of factor can be distinguished. They may function either by reacting specifically with a catalyst in the system or by affecting the colloidal structure of the enzyme (succinoxidase) material (KEILIN und HARTREE).

Tab. 18. Hemmung der Bernsteinsäureoxydation durch Bienengift und Melittin.

Versuchsausführung: s. Methodik. Trockengewicht: 22,2 mg Partikel/Ansatz.

Gift (Endkonzentration)		Sauerstoffaufnahme binnen 20 min (cmm)
Kontrolle		36
ger. Bienengift	1 : 3 300	- 1
	1 : 33 000	- 3
	1 : 330 000	1
	1 : 3300 000	29
	1 : 33000 000	32
Melittin	1 : 3 300	18
	1 : 33 000	33

Ein wesentlicher Einwand gegen unsere Anschauung, daß Melittin ein zweites, unter bestimmten Bedingungen dehydrasenhemmendes Prinzip im Bienengift darstellt, könnte davon ausgehen, daß unsere Melittin-Effekte durch Verunreinigung mit Phospholipase A verursacht seien. Dies konnte durch im folgenden wiedergegebene Zeit-Versuche ausgeschlossen werden:

Es wurden Zellpartikelverdünnungen verschieden lange Zeit mit gereinigtem Bienengift bzw. Melittin vorbehandelt. Dann wurde für gleich lange Zeit Triphenyltetrazoliumchlorid zugesetzt und das gebildete Formazan anschließend extrahiert und gemessen.

Zu 1 ccm Partikelsuspension, welche vorher im Verhältnis 1 : 3 mit Phosphatbikarbonatpuffer pH 7,5 verdünnt war, kamen 0,5 ccm 0,3 m Succinat für 60 bzw. 30 bzw. 0 Minuten bei 30°; anschließend erfolgte Zusatz von Gift bzw. Fraktion I (0,5 ccm in Puffer) und Bebrütung für 0 bzw. 30 bzw. 60 min bei 30°. Schließlich wurden 0,5 ccm 1%ige Triphenyltetrazoliumchloridlösung zugesetzt. Nach 20 min bei 30° erfolgte Extraktion und Bestimmung des gebildeten Formazans wie üblich. Das Trockengewicht pro ccm unverdünnter Partikelsuspension betrug 14,6 mg.

Die Wirkung des gereinigten Giftes auf die Mitochondrien nimmt mit der Zeit stark zu. Eine totale Hemmung der Dehydrierung ist möglich. Die Melittinwirkung ist bei Verdünnungen 1:62500, die von gereinigtem Bienengift noch bei Verdünnungen 1:40 000 000 (60 min Vorinkubation) nachweisbar. Bei Melittin schreitet die Wirkung mit der Zeit sehr viel langsamer fort als beim Bienengift.

Sie setzt nahezu momentan ein. Damit ist ein eindeutiger Unterschied herausgestellt: Melittin ist im Formazan-Test gegenüber dem Bernsteinsäuredehydrasen-System in Leberzellpartikeln ein Inhibitor sui generis (Tab. 19).

Tab. 19. Zeitabhängigkeit der Dehydrasenhemmung durch Melittin und gereinigtes Bienengift (Formazanmethode).

Ansatz: s. Text.

Gift (Endkonzentration)		gebildete Formazanmenge (γ)		
		nicht vorbebrütet	30 min vorbebrütet	60 min vorbebrütet
Kontrolle		88	94	86
Melittin	1 : 2 500	35	-	32
	1 : 12 500	58	-	58
	1 : 62 500	88	-	77
	1 : 312 500	-	-	82
ger.Bienengift	1 : 12 500	0,5	2	1
	1 : 62 500	4	3	1
	1 : 312 500	53	3	2
	1 : 1562 500	72	20	4
	1 : 7812 500	94	83	61
	1 : 39062 500	-	95	77

Ein analoger Versuch, welcher die Zeitabhängigkeit der Dehydrasenaktivierung durch Melittin darstellen sollte, ergab erheblich verwickeltere Befunde. Wie Tab.20 zeigt, nimmt der Grad der Aktivierung mit steigender Inkubationszeit bei niedrigeren Konzentrationen etwas zu, bei höheren dagegen deutlich ab. Möglicherweise erklärt sich die Aktivitätsminderung durch Verunreinigung des benutzten Präparates von Melittin mit Spuren von Phospholipase A; denn das dieses Ferment enthaltende Gesamtgift hemmt die Ferrozyanidbildung noch in Konzentrationen unter 1 : 2 000 000 (vgl. Tab. 15).

Tab. 20. Zeitabhängigkeit der Dehydrasenaktivierung durch Melittin (Ferrizyanidmethode).

Ansätze: analog den S. 18 beschriebenen. Trockengewicht der Partikel: 0,75 mg/Ansatz

Gift (Endkonzentration)		gebildete Ferrozyanidmenge (µm)		
		nicht vorbebrütet	15 min vorbebrütet	45 min vorbebrütet
Kontrolle		2,10	1,56	1,53
Melittin	1 : 25 000	6,28	4,92	3,28
	1 : 125 000	3,23	3,80	3,75
	1 : 625 000	2,04	1,95	2,10

4. Besprechung der Ergebnisse.

Unsere Versuche an Zellpartikeln und Mitochondrien sind als Fortsetzung der Experimente an intakten Zellen von Blut (12), Haut (18) und Muskulatur (14; 18) zu betrachten; in allen Fällen ging es darum, Änderungen der für die Funktion so wichtigen Struktur durch Pharmaka zu erfassen.

Diese Effekte lassen sich primär auf bestimmte physikochemische Eigenschaften der Pharmaka zurückführen. So besitzt Melittin drei kardinale Funktionen (8): es ist sehr stark oberflächenaktiv (12), bei weitem stärker als alle bisher von uns geprüften Eiweißkörper; es ist ferner stark basisch (22); schließlich wird es (was möglicherweise die Folge einer oder beider erstgenannten Eigenschaften ist) sehr stark adsorbiert, wie aus seinem Verhalten bei der Papierelektrophorese und der Chromatographie hervorgeht. Infolgedessen reagiert es sehr stark mit den verschiedensten Bauelementen des Körpers. Die elektronenoptisch sichtbare Verdickung und Schrumpfung der Erythrozytenwand (13), die in Anwesenheit höherer Melittin-Konzentrationen wie gekocht aussehende Muskeloberfläche (18), die Trübung von Eigelb- und Mitochondriensuspensionen (12) sind wohl Folgen eines gleichartigen Grundprozesses. Lysocithin dagegen, das Reaktionsprodukt zahlreicher tierischer Gifte, verursacht zumeist das Entgegengesetzte: zwar erniedrigt es ebenfalls die Oberflächenspannung von Wasser sehr stark (9, 10, 12), löst aber im Gegensatz zu Melittin die Erythrozytenwandung auf (13) und klärt zahlreiche lipoidhaltige Suspensionen, z.B. von Lecithin, Cholesterin, Ölsäure, Eigelb oder Mitochondrien (12). Infolge der vielseitigen, teilweise einander entgegengesetzten Reaktionsmöglichkeiten beider Komponenten gibt es wohl kaum eine in biologischem Sinne reaktive Struktur, die nicht in irgend einer Weise von ihnen angegriffen würde.

Die Zellpartikel als besonders empfindliche Systeme werden verständlicherweise von den Giftstoffen auch besonders stark betroffen. - Unsere eigenen Untersuchungen stellten zunächst eine der wesentlichsten, vorher aber in diesem Zusammenhang noch nicht untersuchten Mitochondrienfunktionen in den Vordergrund: die oxydative Phosphorylierung. Sie wird von tierischen Giften in doppelter Weise beeinflußt: einerseits wird die Fähigkeit, mit

Hilfe der Verbrennungsenergie anorganisches Phosphat in energiereiche organische Verbindungen überzuführen und damit eine große Zahl energieverbrauchender biologischer Reaktionen zu ermöglichen, geschädigt; andererseits sinkt aber auch - dies wurde bereits von früher zitierten Autoren gefunden - die Atmung selbst. Nach unseren Versuchen geht die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung der Atmungshemmung voraus. Inaktivierung löslicher Fermentsysteme, wie der von uns untersuchten, durch Bienen- und Schlangengift beeinflußbaren Hefehexokinase, kann nicht die Ursache hierfür sein. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ist die Phospholipase A der tierischen Gifte nicht nur für die Atmungshemmung, sondern auch für die Entkopplung verantwortlich. Dafür spricht folgendes: das entkoppelnde Prinzip ist relativ thermostabil, so daß die Phosphatasen, Hyaluronidasen, Proteasen, Aminosäureoxydasen tierischer Gifte als Ursachen entfallen; seine Wirkung schreitet zeitlich fort; durch die Spaltprodukte der Phospholipoide, Lysocithin und Oelsäure, ist unter bestimmten Bedingungen ebenfalls eine Entkopplung möglich. Die Frage, ob durch die Phospholipase der Gifte ein für den Zusammenhang der Fermentketten wesentliches Phospholipoid zerstört wird, oder ob durch Zerstörung an sich unwichtiger Phospholipoide Lysocithin frei wird, welches dann irgendwelche wichtigen Lipoide aus der Partikelstruktur herauslöst, kann allerdings mit den bisherigen Methoden nicht entschieden werden. - Neben Phospholipase A haben wir im Bienengift noch einen zweiten, sowohl entkoppelnden als auch atmungshemmenden Faktor, nämlich Melittin. Er wirkt wohl in prinzipiell anderer, nicht fermentativer Weise, und zwar mögen seine oben geschilderten physikochemischen Eigenschaften von Bedeutung sein. Auch Protaminsulfat als stark basischer Eiweißkörper vermag in geeigneten Konzentrationen zu entkoppeln; Melittin könnte also als enorm aktives Protamin betrachtet werden. Dies gilt übrigens nicht nur für das Verhalten gegenüber der oxydativen Phosphorylierung, sondern auch gegenüber anderen Mitochondrienfunktionen (s.u.). Offenbar hemmt die Absättigung saurer Valenzen die Tätigkeit bestimmter Fermentketten.

Neben den phosphorylierenden werden auch die dephosphorylierenden Fähigkeiten von Partikel- und Mitochondrienpräparaten durch Bienen- und Schlangengift beeinflußt. Allerdings ist deren

Effekt je nach verwendetem Partikelpräparat, zugesetztem Substrat und Dauer der Vorinkubation sehr unterschiedlich. Die Pyrophosphatase von Mitochondrien ließ sich durch Vorbebrütung mit Ammodytesgift deutlich hemmen, die Adenosinmonophosphatase dagegen aktivieren. Die adenosintriphosphatspaltende Komponente von Mitochondrien schließlich wurde nicht gehemmt, sondern nur schwerer sedimentierbar. Alle diese Wirkungen beruhen wohl auf der mehr oder minder starken Veränderung der die Phosphatasen normalerweise "tragenden" Partikel durch die Phospholipase der Gifte bzw. durch das von dieser gebildete Lysocithin. Vorläufig kann noch nicht gesagt werden, welcher der drei genannten Effekte - Aktivierung, Löslichkeitserhöhung und Inaktivierung - in vivo der überwiegende Faktor ist; aber wir dürfen wohl annehmen, daß Bienen- und Schlangengift den Phosphatstoffwechsel auf die eine oder andere Weise erheblich stören kann. - Das Verhalten der Phosphatasen gegenüber Melittin muß noch näher untersucht werden.

Das Problem der strukturgebundenen Fermente muß auch bei der Deutung der Versuche über die Bernsteinsäuredehydrierung zur Sprache kommen. Die Hemmung dieses Fermentsystems durch tierische Gifte wurde bereits mehrfach beschrieben. Auch unser (22) Befund, daß die phospholipasehaltige Fraktion dafür verantwortlich ist, paßt zu diesen älteren Ergebnissen.

Neu ist die Beobachtung, daß Bienengift neben der stark hemmenden Phospholipase einen Aktivator der Bernsteinsäuredehydrierung enthält, welcher sich in Melittin befindet. Der Nachweis dieser Aktivierung gelang bisher nur, wenn man Ferricyanid als Elektronenakzeptor benutzte. Die Übertragung von Elektronen auf Triphenyltetrazoliumchlorid wird dagegen nicht nur durch Phospholipase, sondern auch durch Melittin und Protaminsulfat gehemmt. Scheinbar wird also hier die gleiche Reaktion bei Benutzung verschiedener Indikatoren verschieden beeinflußt. In Wirklichkeit dürften die Verhältnisse aber ganz anders liegen. Aus den Befunden von ZÖLLNER und ROTHEMUND (35) geht hervor, daß die Formazanmethode aus verschiedenen Gründen nicht ohne weiteres als Maß der Bernsteinsäuredehydrierung benutzt werden kann. Einerseits ist die Menge der auf Triphenyltetrazoliumchlorid in der Zeiteinheit übertragenen Elektronen viel kleiner als die von anderen Akzeptoren, z.B. Sauerstoff oder Ferrizyanid, aufgenommene.

Andererseits stammt ein Teil derselben wohl gar nicht von der Bernsteinsäure selbst. Unter unseren Bedingungen ist die gemessene Reaktion in Anwesenheit von Ferricyanid viel stärker als in Anwesenheit von Triphenyltetrazoliumchlorid. Man mißt also mit der letztgenannten Substanz etwas anderes als mit Ferricyanid oder Sauerstoff. Es erscheint daher verständlich, daß die offenbar kompliziertere, auch unter optimalen Bedingungen nur geringe Elektronenmengen transportierende Fermentkette zum Triphenyltetrazoliumchlorid durch Melittin geschädigt wird, während die möglicherweise nur an eine relativ einfache Struktur gebundene Reaktion mit Ferricyanid sogar intensiviert wird. Es sieht so aus, als ob diese Substanz als "Detektor" für die Unterschiede von strukturgebundenen Fermentketten benutzt werden könnte. Leider sind wir aber noch im unklaren, wie die Aktivierung der Bernsteinsäuredehydrierung und die Strukturveränderung durch basische Proteine im einzelnen zustande kommt. Möglicherweise läßt sie sich mit der Aktivierung durch verschiedene auf Kolloide wirkende Substanzen (KEILIN und HARTREE (15)) in Verbindung bringen. Elektronenoptische Untersuchungen an Mitochondrien unter dem Einfluß von Melittin, analog den von uns an Erythrozyten durchgeführten, könnten hier vermutlich weiter helfen. Ferner wäre es nötig, möglichst weitgehend gereinigte bernsteinsäuredehydrasen-Präparate der Einwirkung von Phospholipase A oder Melittin zu unterwerfen.

Zusammenfassung

Bienengift sowie sämtliche bisher daraufhin untersuchten Schlangengifte hemmen die Bildung energiereichen Phosphats durch Zellpartikel stärker als deren Atmung. Ursache für diese Entkopplung ist ein thermostabiles Enzym, wahrscheinlich Phospholipase A; denn die Spaltprodukte der Phospholipoide, Lysolecithin und Ölsäure, entkoppeln ebenfalls. Daneben wirkt auch Melittin aus Bienengift in entzündungserregenden Konzentrationen gleichsinnig, wenn auch wesentlich schwächer.

Strukturgebundene Phosphatasen werden durch tierische Gifte schwerer sedimentierbar. Zum Teil werden sie deutlich aktiviert, (z.B. Adenosinmonophosphatase), zum Teil (z.B. Pyrophosphatase) gehemmt.

Die Aktivierung der Bernsteinsäureoxydation durch Melittin aus Bienengift wurde bisher nur bei Benutzung von Ferricyanid als Elektronenakzeptor beobachtet. Bei Verwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid erweist sich dagegen Melittin als zweiter, schwächerer Inhibitor neben der stets hemmenden Phospholipase A.

Summary

Bee venom and the snake venoms hitherto investigated inhibit the particle-bound formation of energy-rich phosphate more strongly than the respiration. The uncoupling is caused by a thermostable enzyme, probably phospholipase A, because its reaction products, lysolecithin and oleic acid, are uncoupling too. Besides of that, melittin from bee venom acts in the same direction, but weaker.

Structure-bound phosphatases become less easily sedimentable under the influence of animal venoms. Partially they are activated (e.g. adenosine monophosphatase), partially inhibited (e.g. pyrophosphatase).

The activation of succinate oxidation by melittin from bee venom could be observed with ferricyanide as electron acceptor only. The reduction of triphenyltetrazoliumchloride, however,

was innibited by melittin, although less strongly than by phospholipase A, which latter inactivated the system with all acceptors investigated.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

Literatur

(1) BERGER,L.,M.SLEIN, S.COLOWICK u.C.CORI — J.Gen.Physiol. 29,379(1946)

(2) BRAGANCA,B. u. J.QUASTEL — Biochem.J. 53,88(1953)

(2a) COOPER,C.,T.M.DEVLIN u. A.L.LEHNINGER — Biochim.Biophys.Acta 18,159 (1955)

(3) CRANE,R. u. F.LIPMANN — J.biol.Chem. 201,235(1953)

(4) FISCHER,F.G. u. H.DÖRFEL — Biochem.Z. 324,465(1953)

(5) FISCHER,F.G. u. W.P.NEUMANN — Biochem.Z. 324,447(1953)

(6) GREEN,D.,W.LOOMIS u.V.AUERBACH — J.biol.Chem. 172,389(1948)

(7) HABERMANN,E. — Naturwissensch. 41,429(1954)

(8) " — Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 222,173(1954)

(9) " — " " " 225,158(1955)

(10) " — Habil.Schr. Würzburg 1955

(11) " — Z.exper.Med. 129,436(1958)

(12) " — Z.exper.Med. 130,19(1958)

(13) " u.E.MÖLBERT — Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 223,203(1954)

(14) HEYDENREICH, H. — Inaug.Diss.Würzburg 1957

(15) KEILIN,D. u.E.HARTREE — Biochem.J. 44,205(1949)

(16) KIELLEY,W. u. E.KIELLEY — J.biol.Chem. 200,213(1953)

(17) LAWACZECK,H. — Biochem.Z. 145,351(1924)

(18) LAMPARTER,W. — Inaug.Diss.Würzburg 1954

(18a) MACFARLANE,M.G. u.G.M.HARRIS — Congr.intern.biochim. Rés. commun.,Paris 1952,396; zit.n.C.A. 50,5063(1956)

(19) MAGISTRIS,H. — Biochem.Z. 210,85(1929)

(20) MARTLAND,M.,F.HANSMAN u. R.ROBISON — Biochem.J. 18,1152(1924)

(21) MEYERHOF,O. — Biochem.Z. 183,176(1927)

(22) NEUMANN,W. u. E.HABERMANN — Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 222,367(1954)

(23) NEUMANN,W. u. E.HABERMANN — Nature 180,1284(1957)

(24) NEUMANN,W. u. E.HABERMANN — Pharmacol.Rev. (in Vorbereitung

(25) NYGAARD,A.P., M.DIANZANI u. G.BAHR — Exp.Cell Res. 6,453(1954)

(26) QUASTEL,J. u. A.WHEATLEY — Biochem.J. 32,936(1938)

(27) SAUNDERS,L. — J.Pharmacy a.Pharmacol. 9,834 (1957

(28) SAUNDERS.L., I.L.THOMAS u. N.ROBINSON — Nature 181,782(1958)

(29) SCHNEIDER,W. u. G.HOGEBOOM — J.bi... Chem. 183,123(1950)

(30) SINGER,T. u. E.KEARNEY — Biochim.Biophys.Acta 15,151(1954)

(31) SZEKELY,M.,S.MANYAI u.F.STRAUB — Acta Physiol.Acad.Sci.Hung. 4,31(1953)

(32) WITTER,R.F. u. M.A.COTTONE — Biochim.Biophys.Acta 22,372(1956)

(33) WITTER,R.F.,A.MORRISON u. G.R.SHEPARDSON — Biochim.Biophys.Acta 26,120(1957)

(34) ZELLER,E.A. — Helv.Chim.Acta 33,821(1950)

(35) ZÖLLNER,N. u.E.ROTHEMUND — Z.physiol.Chem. 298,97(1954)